Beobachtungen bei der Vergärung von Disacchariden durch Fusarium lini Bolley

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
genehmigt
von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Werner Engel

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 1939

Tag der Promotion: 15. April 1939

VERLAG RUDOLPH PFAU :: BERLIN NW 7

N 5

Referenten: Prof. Dr. K. Noack
Prof. Dr. L. Diels

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung (Theoretischer Teil) 5

a) Ziele der vorliegenden Untersuchungen 9

b) Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen 9

Hauptteil (Experimenteller Teil) 13

1. Verfahren und Methoden 13

2. Vergärung der Maltose 16

a) Gärverlauf an Hand der CO_2-Entwicklung 16

b) Beobachtungen über die Phosphorylierung der Maltose 19

c) Die Alkoholbildung bei der Vergärung der Maltose 21

d) PH-Veränderungen 21

e) Maltosevergärung in verschiedenen PH-Bereichen 22

f) Die Suche nach Carbohydrasen 24

g) Die intermediär auftretende Glucose 28

h) Gibt es einen Maltose-Phosphorsäureester 29

3. Die Isolierung der Gluconsäure 33

4. Die Isolierung der Milchsäure 38

5. Die Vergärung der Lactose 39

a) Allgemeines Vergärungsbild 39

b) Der Einfluß des anorganischen Phosphats 40

c) Die Suche nach der Lactase 43

6. Die Vergärung der Saccharose 45

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0173

Neben einem weit verbreiteten Flachsanbau in Schottland, Irland, Belgien, Rußland, den Vereinigten Staaten von Nordamerika und einigen südosteuropäischen Ländern ist auch Deutschland zur Zeit durch den Rohstoffmangel für Faserstoffe gezwungen, zu einem gesteigerten Flachsanbau zurückzukehren. Es ist daher von Bedeutung, daß bereits Lugger[1] feststellte, daß bei Flachskulturen, die mehrere Jahre hintereinander auf den gleichen Feldern standen, der Ertrag und auch die Qualität der gewonnenen Faser stark nachließen. Die Ursache dieser Erscheinung, die sogenannte Flachsmüdigkeit des Bodens, ist seit Jahrzehnten insbesondere auch in den nördlichen Gebieten der Vereinigten Staaten Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen und führte zur Entdeckung des Erregers des Flachsbrandes, auch Flachswelke genannt. Wie allgemein bekannt die Krankheit ist, geht daraus hervor, daß Nypels[2] in Belgien von „La brûlure du lin" und Boekema[3] in Holland von einem „Vlasbrand" spricht. Der Erreger selbst wurde von H. L. Bolley[4] im Jahre 1900 in Amerika entdeckt und von ihm als ein Mitglied der Gattung der Fusarien erkannt.

Der Flachs wird von dem Erreger in jeder Wachstumsperiode angegriffen und stirbt unter dem Einfluß der Krankheit bald ab. Dies ist die Ursache der einleitend erwähnten Flachsmüdigkeit des Bodens. Bei einer kräftigen Infektion greift die Flachswelke sehr rasch um sich, und der Keimling wird bereits abgetötet, bevor er die Erdoberfläche erreicht hat. Solche Stellen erscheinen innerhalb großer Flachsanpflanzungen als Krankheitszentren, welche sich während des Sommers durch Sporen weiter verbreiten und allmählich den ganzen Flachskulturen gefährlich werden. Junge Pflanzen welken dann plötzlich hin, vertrocknen und verfallen, sobald eine feuchte Witterung einsetzt, ältere Pflanzen welken zuerst an den Spitzen der Blätter und sterben langsam ab.

---

1. Minnesota Experiment Station, Bulletin 13 S 26.
2. Compte-rendu de la Société royale de botanique de Belgique. 36, 183 (1897).
3. Landbouwkundig Tijdschrift, 1893, 59 en 105.
4. North Dakota, Experiment Station, Bull. 50 (1901).

Der Erreger der Flachswelke, Fusarium lini Bolley (flB.), ein in die Ordnung der Ustilaginales (Brandpilze) gehörender Basidiomycet, gehört innerhalb der Gattung der Fusarien in die Gruppe — elegans und Untergruppe — orthocera und befällt neben Linum usitatissimum auch Allium und Trifolium.[5] Der Erreger bildet auf künstlichen Nährböden einzellige Mikrokonidien und viele, birnenförmige, meist einzellige Chlamydosporen. Ihm sehr nahe stehend ist das Fusarium oxysporum. Ueber den Wirkungsmechanismus der Erkrankung sind bisher nur Vermutungen geäußert worden. Unter diesen ist die Auffassung von Tochinai[6] zu erwähnen, der die Ansicht äußert, daß die vom Erreger erzeugte Kohlensäure die Wirtspflanze zum Ersticken bringt. Beweise aber hat Tochinai für diese Behauptung nicht erbracht. Sie kann aber insofern mit den zu beschreibenden Untersuchungen in Verbindung gebracht werden, als die Kohlensäure durch das Enzymsystem von flB. unter anderem aus Kohlehydraten gebildet wird.

Der Mechanismus der alkoholischen Gärung kann zur Zeit mit Hilfe drei verschiedener Zellsysteme untersucht werden, welche den Anspruch zu Analogieschlüssen rechtfertigen. Aus der Lehre vom Stoffwechsel der lebenden Hefezelle, von Hefepräparaten oder -säften ist bekannt, daß Hexosen durch die Zymasen im Verhältnis von $2CO_2 : 2C_2H_5OH$ zerlegt werden. Aehnlich liegen die Verhältnisse beim Abbau des Zuckers durch das Thermobacterium mobile Lindner,[7] welches nach Kluyver und Hoppenbrouwer[8] äquimolekulare Mengen Kohlensäure und Alkohol liefert. Als Nebenprodukt entsteht Milchsäure, während der Zucker im ganzen zu rund 95% vergoren wird. Aus den Untersuchungen von F. F. Nord und Mitarbeitern[9] ist in jüngster Zeit bekannt geworden, daß der stöchiometrisch erfaßbare Stoffwechsel sowohl lebender Fusarienzellen als auch von Trockenpräparaten mit dem der vorgenannten Enzymsysteme vergleichbar ist, denn das Verhältnis von Alkohol zu Kohlensäure (berechnet auf C) ist bei Hexosenvergärung 2 : 1, bei Ver-

5. Wollenweber und Reinking, Die Fusarien. Berlin (1935), 117.

6. Tochinai, Journ. College of Agriculture. Hokkaido, Imp. Iniv. 14 Pt 4, 193, 215 (1926).

7. P. Lindner, Zft. d. V. f. Zuckerindustrie 81, 23 (1931).

8. Arch. f. Mikrobiologie 2, 245 (1931).

9. Bio. Z. 285, 241 (1936); 288, 414 (1936); 288, 421 (1936); 293, 231 (1937). Naturw. 24, 689 (1936); F. F. Nord, Mechanism of Enzyme-action and Associated Cell Phenomena, Baltimore 1929.

gärung einer Pentose 1 : 1. Für die Vergleichbarkeit des Leistungsmechanismus des Fermentsystems der Hefe mit dem von flB. spricht außerdem die Angabe von Mahdihassan,[10] nach welcher die zellinnere H-Ionenkonzentration von Hefe XII bzw. flB. im Bereich von 5,9 bis 6,0 bzw. von 6,0 bis 6,1 liegt. FlB. besitzt außerdem ein sehr kräftiges Dehydrasesystem, welches es befähigt, Aethylalkohol, Polyvinylalkohol, Essigsäure und dgl. als einzige C-Quelle zu verwerten und unter CO_2-Entwicklung zu dehydrieren. Im Laufe dieser Dehydrierung sind eine ganze Reihe organischer Säuren nachgewiesen und gefaßt worden. Auch in dieser Hinsicht ist dieses Enzymsystem mit dem Fermentsystem der Hefe zu vergleichen, welche allerdings erst nach Befreiung von zelleigenen Reservestoffen den Aethylalkohol zu dehydrieren vermag.[11]

Die vorgenannten Untersuchungen sind aber noch unter einem anderen Gesichtspunkt zu werten. Die Frage, ob die Dissimilation der Kohlenhydrate durch das Enzymsystem der Hefe bzw. zymasehaltiger Hefepräparate oder durch Hefesäfte zwangsläufig durch eine Phosphorylierung eingeleitet werden muß, konnte trotz der Unzahl von Arbeiten bisher nicht entschieden werden. Und zwar aus dem einfachen Grunde, weil eine Beobachtung, ob die lebende Hefezelle den ihr gereichten Zucker vor dem Uebergang in die zuerst von Neubauer[12] angenommene, intermediär auftretende Brenztraubensäure tatsächlich durch zelleigene oder zellfremde Phosphor-Donatoren verestert, in der gesamten Literatur des In- und Auslandes fehlt.[13] Sämtliche Schlüsse, die die Notwendigkeit der einleitenden Phosphorylierung betonen, rühren aus Versuchen her, die mit Hefe- oder Muskel s ä f t e n bzw. - p r ä p a r a t e n ausgeführt wurden. Erst die oben erwähnten Untersuchungen über den Stoffwechsel l e b e n d e r Fusarienzellen (fus. lini und oxysporum) haben den Beweis erbracht, daß sowohl Hexosen wie Pentosen von diesen Enzymsystemen in einer den stöchiometrischen Verhältnissen mit der Hefegärung ähnlichen Weise abgebaut werden können, o h n e

10. Bio. Z. 226, 203 (1930); H. Pfeifer, Protoplasma 12, 427 (1931).

11. Wieland, Claden, Wille Liebigs Ann. 492, 183 (1932); 503, 70 (1933).

12. O. Neubauer, Z. f. physiol. Chem. 70, 350 (1910).

13. Eine einzige Ausnahme hiervon ist in der Mitteilung von C. Neuberg zu erblicken, der bei seinen Versuchen als Substrat jedoch nicht ein Kohlehydrat, sondern einen Kohlehydratmonoester verwandte. (Bio. Z. 280, 163 (1935).

daß dieser Vorgang durch eine Veresterung mit anorganischem Phosphat in der lebenden Zelle eingeleitet worden wäre. Bei weiteren Versuchen mit lebendem Zellmaterial ergab sich noch die Feststellung, daß das Ausmaß der Phosphorylierung einen bestimmten Prozentsatz des vorhandenen anorganischen Phosphats nicht überschreitet. Auch Konzentrationsänderungen des Substrats und der angewandten Phosphormengen, wie Zusätze von Muskel-adenylsäure oder Toluol, ergaben kein anderes Bild. Es bestätigt sich aus diesen Untersuchungen die bereits früher von Nord vertretene Auffassung, daß eine Uebertragung von an sich richtigen Versuchen mittels zellfreier Enzymsysteme auf die Reaktionsfolge der lebenden Zelle nur mit der Einschränkung zulässig ist, daß sie allenfalls einen Teil der in der lebenden Zelle ablaufenden Reaktionen darstellen.

Es erschien unter diesen Umständen erwünscht, das Verhalten von Disacchariden (Maltose, Lactose, Saccharose) bei der Vergärung durch das Enzymsystem lebender Zellen von flB. einer Untersuchung zu unterwerfen. Die Vergärung der Disaccharide hat ein besonderes Interesse, weil über den Abbauweg und die Phasenfolge der Vergärung dieser wichtigen Kohlenhydrate durch Hefe noch keine Entscheidung getroffen werden konnte und weil über die Rolle der Phosphorylierung, d. h. ob sie überhaupt und an welcher Stelle der Phasenfolge sie sich einschaltet, keine Beobachtungen vorliegen. Als Voraussetzung für die Vergärbarkeit der Disaccharide galt früher ganz allgemein die Anwesenheit spezifischer Carbohydrasen im Enzymsystem der betreffenden Erreger. Noch in jüngster Zeit äußern sich z. B. Armstrong und Armstrong[14] zu dieser Frage wie folgt: „maltose is formented only by those yeasts which contain maltase and then not until hydrolysis has been brought about by the enzym" und später „only those yeasts which contain lactase are capable of fermenting milk-sugar"; dann sagen sie bezüglich Rohrzucker „cane sugar is fermented by yeasts only after previous inversion with the invertase of yeast". Durch Untersuchungen von R. Willstätter, G. Oppenheimer an der Lactose,[15] E. Bamann und W. Steibelt an der Maltose[16] wurde nun die Frage aufgerollt, ob auch die Möglichkeit einer direkten Vergärung von

14. Armstrong a. Armstrong, The Carbohydrates, London 1934, 5. Aufl. S. 164, 170, 179.

15. Z. f. physiol. Chemie 118, 168 (1922).

16. Z. f. physiol. Chemie 115, 211 (1921).

Biosen bestehe. Sie haben in der Hefe für die Maltose und Lactose die Existenz besonderer Zymasen angenommen, die die genannten zusammengesetzten Zucker vergären, ohne daß vorher eine Aufspaltung zu Monosen erfolgt. H. Sobotka und M. Holzman[17] glaubten diese Befunde mit Hilfe einer besonderen amerikanischen Hefe, die bei einem pH = 2,5 sowohl lebt als auch gärt und sich vermehrt, bestätigen zu können und nahmen infolgedessen die Existenz einer besonderen Maltozymase an. Sie setzten hierbei jedoch voraus, daß als Zwischenphase bei der direkten Folge der Biosenvergärung die Stufe eines Disaccharidphosphats (ähnlich den isolierten Hexoseestern) durchlaufen wird. Zu dem Ergebnis, daß Disaccharide eine direkte Vergärung erleiden können, gelangte neuerdings auch H. D. Wright[18] bei der Vergärung von Lactose durch Streptococcus thermophilus.

Für die Untersuchung dieses Fragenkomplexes und die Erfüllung experimentell unbedingt erforderlicher Voraussetzungen liegen die Verhältnisse bei flB. günstiger; denn der Reaktionsverlauf ist langsamer und gedehnter. Es besteht hier daher die Möglichkeit, in den Chemismus und die Kinetik gerade der ersten Phasen der Kohlehydrat-Dissimilation Einblick zu gewinnen, der beim raschen Verlauf in der unversehrten Hefezelle praktisch unmöglich ist. Darüberhinaus wächst flB. im pH-Bereich von 1,9 bis 12,0 und zeigt ein gutes Wachstum bei pH = 3,5 bis 9,5.

Bevor ich an die Vergärung der Disaccharide in Versuchsreihen ging, hatte ich zuerst festzustellen, ob im Enzymsystem meines Erregers neben den bisher gefundenen Zymasen, Dehydrasen und Phosphatasen auch Carbohydrasen vorhanden sind, bzw. in welchem pH-Bereich sie ihre Tätigkeit entfalten können. Nach dieser Feststellung wurden Vergärungen von Maltose, Lactose und Saccharose in Angriff genommen, wobei ich bei der Durchführung der Versuche nach zwei Gesichtspunkten vorging. Die Kinetik des Gärverlaufs wurde in demjenigen pH-Bereich bestimmt, in welchem sowohl hexosenspezifische Zymasen als auch Carbohydrasen optimal wirksam waren, andererseits wurde die Vergärung unter völliger Ausschaltung oder Abwesenheit von Carbohydrasen ausgeführt.

Im Verlauf dieser Versuche über die Vergärung der Disaccharide konnte ich zuerst zeigen, daß einmal Maltose langsamer als Glu-

17. Biochem. J. 28, 734 (1934).
18. J. of Pathol. a. Bacteriol. 43, 487 (1936); 45, 117 (1936).

cose und, wie der Ablauf der Kohlensäureentbindung erkennen läßt, auch unregelmäßiger vergoren wird. Die Phophorylierung des Zuckers tritt schwach und wiederholt (2 bis 3mal) auf, während eine einleitende Phosphorylierung, die der Kohlensäure-Entbindung vorhergehen würde, auch bei Deckenimpfung und verfeinerten Versucksmethoden nicht beobachtet wurde. Die grundsätzliche Feststellung stimmt gut überein mit den jüngsten Beobachtungen von Needham und Lehmann[19] am Hühnerembryo, die eine von einer Phophorylierung eingeleitete Glykolyse höchst unwahrscheinlich machen. Außerdem konnte Thunberg[20] aus seinen Versuchen über den oxydativen Stärbeabbau durch ein im Gurkensamen befindliches Enzym folgern, daß dieser Vorgang eine vorherige Phophorylierung nicht voraussetzt. Wachstumsversuche auf Maltose bei pH = 5,2 zeigten die größte Mycelausbeute. Bei der Suche nach Carbohydrasen fand ich eine im pH-Bereich von 3,6 bis über 7,8 wirksame α-Glucosidase (Maltase), die ein Wirkungsoptimum bei pH = 5,3 besaß, während eine Lactase bei flB. nicht vorhanden ist. Im stark sauren Gebiet von pH = 3,3 zeigten die CO_2-Kurven gärender Maltose im Gegensatz zu dem unregelmäßigen Verlauf in maltasewirksamen pH (4,8) ein regelmäßiges Bild. Vergleichende Gärversuche an Glucose und Maltose bei pH = 5,2 und 3,2 ergaben, daß die CO_2-Werte bei der Maltosevergärung in diesen beiden pH-Bereichen einen größeren Unterschied aufweisen, als bei der Vergärung der Glucose. Es ist hieraus zu schließen, daß dieser größere Unterschied dadurch bedingt ist, daß im höheren pH-Bereich die Maltose z. T. erst nach erfolgter Spaltung in Glucose, also indirekt vergärt. Das in diesem Bereich vorhandene Substrat der Gärung ist demnach als Mischsubstrat ungleicher Gärwertigkeit anzusprechen, welches den unregelmäßigen Verlauf der CO_2-Kurve im Gegensatz zu demjenigen im pH-Bereich von 3,2 bedingt. Bei ausgeschalteter Maltasewirkung wird die Maltose in Gegenwart anorganischen Phosphats n i c h t phosphoryliert. Im Einklang mit meiner Feststellung steht die Beobachtung von Yamamoto,[21] der mitteilt, daß in Ammoniumsulfat suspendierte Kaninchen-Erythrocyten Maltose auch nicht zu phosphorylieren vermögen. Es erhob sich daher die Frage nach den Substraten, die in Maltosenährlösungen mit maltase-wirksamen pH = 5,2 die beobachtete Phophorylierung verursachten. Inter-

19. Needham und Lehmann, Biochem. J. 31, 1237 (1937).
20. Thunberg, Skandinav. Arch. f. Physiologie 75, 259 (1937).
21. Yamamoto, J. of Biochem. (Japan) 24, 467 (1936).

mediär auftretende Glucose kann nicht allein als phosphorylierender Zwischenkörper angesehen werden; denn Wachstumsversuche bei verschiedener Glucosekonzentration zeigten, daß erst bei einem Zuckergehalt von 0,001% (50 mg Glucose in Gegenwart von 140 mg KH_2PO_4) eine Phosphorylierung gemessen werden konnte. Bei in der Phase der Phosphorylierung abgebrochenen Maltosemaischen in maltase-wirksamen pH = 5,2 müßten bei einem Phosphorschwund von 15 mg theoretisch 86,7 mg Glucose gefunden werden. Es konnte aber Glucose bis zur unteren Grenze von 20 mg nicht nachgewiesen werden.

Der Verlauf der Lactosegärung ist unregelmäßig und noch langsamer als bei der Maltose. Es ergibt sich hier die bemerkenswerte Tatsache, daß der Erreger auf phosphorfreien Lactosenährlösungen besser wächst, als auf solchen mit anorganischem Phosphat, wobei sogar eine auf Mono-ester berechnete Menge anorganischen Phosphats (750 mg KH_2PO_4 auf 2 g Zucker) stark hemmend wirkt. Da flB. keine Lactase besitzt, nach Ablauf von 6 bis 8 Tagen aber eine Phosphorylierung zu beobachten ist, muß sich in meinen Nährlösungen ein Lactose-phosphorsäureester bilden. Die Hydrolysenprodukte der Lactose werden schneller als der Zucker selbst vergoren und beide, Glucose wie Galaktose, werden phosphoryliert. Die Saccharose zeigte eine geringere Gärgeschwindigkeit als die Glucose, erwies sich aber für Gärversuche in verschiedenen pH-Bereichen als ungeeignet, da sie in saurem pH eine meßbare Hydrolyse zeigte.

Die Vergärung der Disaccharide führte darüber hinaus zu einem weiteren, interessanten Ergebnis. Nach einer Gärdauer von nur wenigen Tagen bildete flB. auf Nährlösungen der Disaccharide (besonders ausgeprägt bei Lactose) keine zusammenhängende Myceldecke mehr und zeigte ein sonst nicht beobachtetes Luftmycel, während im Gärraum trotz der entwickelten Kohlensäure ein meßbarer Unterdruck vorhanden war. Es mußte hier atmosphärischer Sauerstoff unter dem Einfluß eines bei flB. noch nicht nachgewiesenen Enzyms auf einen vorhandenen oder intermediär auftretenden Donator übertragen worden sein. Die Wiederholung dieser Versuche bei abnorm hoher Glucose- wie Maltosekonzentration bei starker Durchlüftung der Nährlösung führte zur Isolierung von d-Gluconsäure. Es ist damit der Beweis erbracht, daß das Enzym Glucoseoxydase, das bisher nur bei säurebildenden Aspergillaceen, Penicil-

lien und anderen Mycelpilzen[22] gefunden wurde, in flB. vorhanden ist. Die Glucoseoxydase nimmt unter den Oxydationsenzymen eine Sonderstellung ein, da sie cyan-unempfindlich ist, auf die Oxydation von Glucose, Mannose usw. spezifisch eingestellt ist und dabei nur freien Sauerstoff hydriert. Es konnte aber nicht entschieden werden, ob die gefundene Gluconsäure möglicherweise durch Hydrolyse einer gebildeten Maltosecarbonsäure,[23] die infolge direkter Oxydation der Maltose durch die hypothetische Maltose-oxydase gebildet werden soll, durch die Maltasewirkung von flB. entsteht. Die auffallend niedrigen Mengen an d-Gluconsäure, die ich in meinen Versuchsreihen mit Maltose isolierte, könnten jedoch vielleicht darauf hinweisen, daß die intermediär gebildete Glucose bei der Maltosevergärung als Donator für die Gluconsäurebildung fungiert, wenn man die wesentlich größere Gärgeschwindigkeit der Glucose im Vergleich zur Maltose in Betracht zieht.[24] Neben der isolierten Gluconsäure wurde in Uebereinstimmung mit früheren Befunden[25] aus den Maischen auch Milchsäure nachgewiesen und hier isoliert.

Ich kann also zusammenfassend an Hand meines Tatsachenmaterials über die Vergärung der Disaccharide sagen, daß sie sowohl direkt als auch indirekt im entsprechenden pH-Bereich vergoren werden können und bei der direkten Vergärung keiner Phosphorylierung zu unterliegen brauchen (Maltose), während eine einleitende Phosphorylierung weder bei Maltose noch bei Lactose beobachtet wurde. Weiterhin wurde bei ungünstigen Wachstumsbedingungen die Wirkung eines bei Fusarien noch nicht nachgewiesenen Enzyms, der Glucose-oxydase, beobachtet und als Beweis die Gluconsäure isoliert.

---

22. D. Müller, Ergebn. d. Enzymf. Bd. V 269 (1936). J. Ramsbottom, The uses of fungi, British Association for the advancements of science 1936, 214.

23. P. Pratesi, Bio. Z. 267, 238 (1933).

24. Bei der Vergärung von Glucose durch flB. wurden Versuche bei starker Durchlüftung in Gegenwart von $CaCO_3$ nicht durchgeführt und aus diesem Grunde mußte dementsprechend auch der Nachweis der Gluconsäure unterbleiben.

25. l. c. 9.

Experimenteller Teil.

Verfahren und Methoden.

Bevor ich auf meine Versuchsreihen näher eingehe, erscheint es mir zur Vermeidung von Wiederholungen zweckmäßig, einige immer wiederkehrende Verfahren und Beobachtungen vorwegzunehmen. Für die Gärversuche stand mir ein Stamm von Fus. lini B. aus der Biologischen Reichsanstalt zu Berlin-Dahlem zur Verfügung, der auch für frühere Arbeiten über Hexosen- und Pentosenabbau verwandt worden war. Um das Enzymsystem des Erregers während meiner Versuchsreihen unter gleichen natürlichen Bedingungen zu halten, wurde flB. alle 2 Wochen abwechselnd auf Glucosenährlösung und in heißem Wasser gequollenen Leinsamen übergeimpft. Die Kulturen wurden laufend mikroskopisch auf ihre Reinheit untersucht. Es wurde stets darauf geachtet, daß das Alter der zum Impfen verwandten Kulturen das Gleiche war, um den Gärverlauf nicht biologisch entscheidend zu beeinflussen. Ich verwandte nur Kulturen, die 3 bis 7 Tage alt waren.

Da bei Massenzüchtungen von flB. in den üblichen Fernbachkolben auch unter günstigen Bedingungen nur wenige g Trockensubstanz anfallen, wurde bei uns ein Steril-Incubator entwickelt und konstruiert, der es mir für Untersuchungen des Enzymsystems des Erregers erlaubte, aus ungefähr 50 l Nährlösung in einer Wachstumsperiode von 12 Tagen bei einer Bruttemperatur von 28° bis 120 g lufttrockene Myceldecken zu ernten. Die dabei verwandte Nährlösung hatte folgende

Zusammensetzung: auf 1000 ccm Leitungswasser

	10 g	Kartoffelstärke
	2 g	Traubenzucker
pH = 6.8	0,2 g	Asparagin
	1,25 g	$K_2HPO \cdot 7\ H_2O$
	0,75 g	$MgSO_4$

Der Steril-Incubator[26] vereinigt in sich einen Sterilisator und einen Brutschrank, in dem je nach Bedarf die in 2 Kolonnen über-

26. l. c. 9. Auch E. Dammann, Z. f. Bact. u. Parasitenkunde, im Druck.

einander angeordneten 14 flachen Schalen mit je 3 bis 3,5 Liter Fassungsvermögen nach dreimaligem Sterilisieren durch seitliche Tuben geimpft werden. Die Bedingungen der Sterilität bleiben während der folgenden Wachstumsperiode auch bei reichlicher Durchlüftung erhalten. Glastüren erlauben ein genaues Verfolgen der Mycelbildung. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Decken von der Nährlösung abgehoben, durch häufiges Waschen mit sterilem Leitungswasser von Nährlösungsresten gereinigt, abzentrifugiert und auf Tontellern 1 bis 2 Tage für die weitere Verarbeitung lufttrocken gemacht.

Um den Gärverlauf und damit verbundene Mycelveränderungen genau verfolgen zu können, benutzte ich als Serienkolben 300 ccm Erlenmeyerkolben, in denen unter sterilen Bedingungen 50 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit vergoren wurden. Da bekanntlich Disaccharide beim Sterilisieren im Dampftopf eine merkliche Hydrolyse erleiden, verwandte ich die Bergefeld-Filterkerze. Die zur Vergärung gelangenden Zuckerlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Nährlösung mit anorgan. Phosphat	Nährlösung ohne Phosphat
50 ccm Aqua dest.	50 ccm Aqua dest.
1 g Kohlehydrat	1 g Kohlehydrat
0,01 g Asparagin	0,01 g Asparagin
0,04 g $MgSO_4 . 7\ H_2O$	0,04 g $MgSO_4 . 7\ H_2O$
0,75 g KH_2PO_4 (später 0,14 g)	
(0,75 g auf Monoester berechnet)	

Im Laufe der Versuche ergab sich, daß unser Erreger nie in der Lage war, die auf Monoester berechnete anorganische Phosphatmenge auch nur annähernd zu verestern. Diese Phosphatmengen wirkten bei Lactose sogar hemmend auf die Vergärung. Daher wurden später nur noch 140 mg KH_2PO_4 in die Zuckerlösung gegeben. In vielen Versuchsreihen war es von größter Wichtigkeit, in einigen Kolben vollkommen phosphatfrei zu arbeiten. Ich ging daher von der Methode, die Nährlösung mit einem mit flB. infizierten Leinsamen zu impfen, dazu über, nur einige Chlamydosporen aus einer Leinsamenkultur mit dem klebrigen Platinspatel in die Untersuchungslösung überzuimpfen. Um auch dem Einwand zu begegnen, daß die Nährlösung vielleicht doch geringe Phosphormengen enthielt, dampfte ich 1 Liter phosphorfreie Nährlösung auf

ungefähr 10 ccm ein und untersuchte diese Flüssigkeit nach der weiter unten angeführten Phosphorbestimmungsmethode nach Briggs. Es konnte keine Phosphor-Anwesenheit festgestellt werden. Wenn man die Genauigkeit dieser Methode berücksichtigt, die noch 0,00005 mg Phosphor für einen Liter Zuckerlösung angezeigt hätte, so kann man dann beinahe nur noch von der Beeinflussung eines Spurenelements sprechen.

Nach dem Impfen des Substrats wurden die Versuchskolben am Gummistopfen paraffiniert, mit Klemmschrauben versehen und während der Versuchsdauer im Brutschrank bei 28° aufbewahrt. Entsprechend der Gärgeschwindigkeit wurde nach bestimmter Zeit die gebildete Kohlensäure gemessen, der pH-Wert laufend verfolgt und aus den phosphathaltigen Lösungen mit steriler Pipette je 1 ccm entnommen, mit Aqua dest. auf 100 ccm aufgefüllt und mit ein paar Tropfen Chloroform oder Toluol für spätere Phosphorbestimmungen haltbar gemacht.

Die gebildete Kohlensäure wurde nach der von Truog[27] und von Nord und Mitarbeitern weiterentwickelten Angabe in einem mit Glaskugeln gefüllten Glasturm an $Ba(OH)_2$ gebunden und die überschüssige Barytlauge mit n 1 HCl gegen Phenolphthalein zurücktitriert. Da während des Verdrängens der Kohlensäure aus den Versuchskolben durch CO_2-freie Luft möglicherweise Alkohol mitgerissen wird, schaltete ich einen mit 30 ccm conc. H_2SO_4 beschickten und zur Vergrößerung der Oberfläche mit Glaskugeln gefüllten Turm vor den $Ba(OH)_2$ Turm, in dem nach Beendigung des Versuches auch der Gesamtalkohol nach Dox und Lamb[28] bestimmt wurde. Hierzu sättigt man die Versuchslösung mit 25 bis 30 g $(NH_4)_2SO_4$, um die Löslichkeit des Alkohols stark herabzusetzen und saugt durch 4stündiges Luftdurchleiten im Wasserbad bei 45—50° den Alkohol in den Schwefelsäureturm quantitativ ab. Der Inhalt des Turmes wurde dann in verdünntem Zustand 20 min mit 30 g $K_2Cr_2O_7$ oxydiert und im Claisenkolben die entstandene Essigsäure bis zur Schaumbildung der eingedampften Lösung überdestilliert. Ein nochmaliges Zugeben von 100 ccm Aqua dest. und Abdestillieren von 50 ccm (solange wiederholt, bis in dem Destillat nicht mehr als 4 mg Essigsäure titriert werden) ergibt die restliche Essigsäure, so daß man in Haupt- und Nachdestillaten mit n/5 KOH

27. J. of Indust. a. Eng. Chem. 7, 1045—1049 (1915).
28. J. of the Amer. Chem. Soc. 38, 2562—2568 (1916).

gegen Phenolphthalein die gesamte Essigsäure mit einer Fehlergrenze von ± 3% bestimmen kann.

Die Phosphorbestimmung wurde nach Briggs[29] ausgeführt. Für diese Bestimmung wurde 1 ccm meiner Untersuchungslösung mit Aqua dest. im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt, 5 ccm zur weiteren Bestimmung herauspipettiert, mit

1 ccm 20%iger Trichloressigsäure
1 ccm Ammoniummolybdat in 5n H_2SO_4
1 ccm 1%iger Hydrochinonlösung
1 ccm 20%iger Na_2SO_3-Lösung

in einem 10 ccm Meßkolben aufgefüllt und mit einer Vergleichslösung von bekanntem Phosphorgehalt (in 10 ccm waren 0,25 mg Phosphor unter gleichen Bedingungen wie in der Untersuchungslösung gelöst) nach einhalbstündigem Stehen in 20, 30 und 40 mm Schichthöhe kolorimetriert. Durch dieses Vorgehen konnte ich mit geübtem Auge die Fehlergrenze der Bestimmung auf ± $0{,}4 \cdot 10^{-3}$ mg P herabdrücken.

Um auch Veränderungen des Zuckergehalts meiner Versuchslösungen genau verfolgen zu können, entschied ich mich für die Methode nach Bertrand,[30] da meine 0,5 bis 2%igen Zuckerlösungen polarimetrisch schwer zu bestimmen waren. Die Methode wurde für einen Bereich von 10 bis 90 mg zu reduzierender Substanz in 20 ccm Lösung benutzt und die gefundenen Werte in empirischen Tabellen für den entsprechenden Zucker abgelesen. Zum Titrieren wurde eine $^1/_{10}$ $KMnO_4$-Lösung benutzt, deren Titer alle 6 Tage gegen Ammoniumoxalat kontrolliert wurde. 1 ccm meiner $^1/_{10}$ $KMnO_4$-Lösung entsprach allgemein 6,37 mg Cu. Bei konzentrierteren Zuckerlösungen wurde die polarimetrische Methode zum Vergleich herangezogen.

Vergärung der Maltose.

a) *Gärverlauf an Hand der CO_2-Entwicklung.*

Anknüpfend an die Erfahrungen vorangegangener Arbeiten über den enzymatischen Abbau von Pentosen und Hexosen durch Fusarien, wurden Glucose und Maltose unter gleichen Bedingungen im

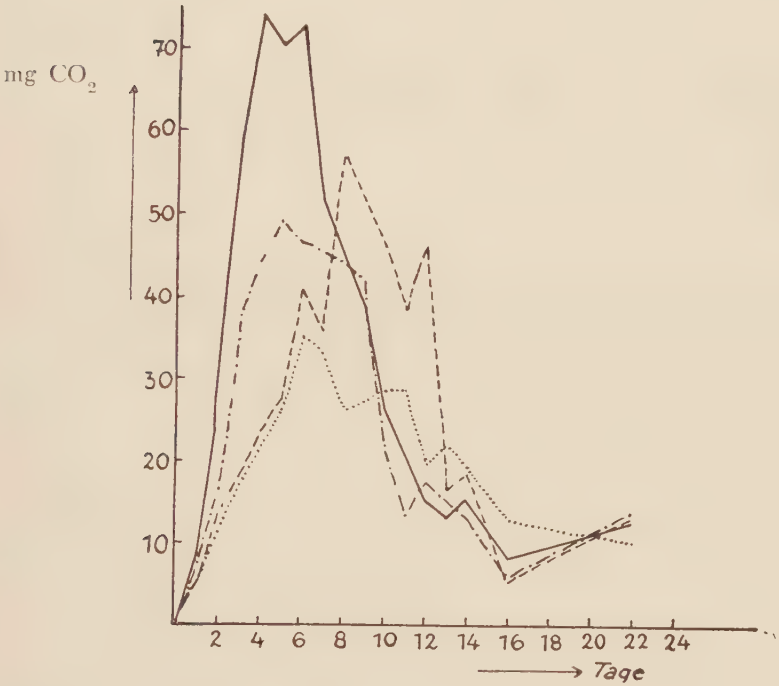
29. J. of biol. Chem. 59, 255 (1924).

30. Abderhalden, Handb. d. biol. Arbeitsmeth. I, 5, 174; vergl. auch Euler Z. f. physiol. Chem. 112, 193 (1921); K. Myrbeck. Z. f. physiol. Chem. 158, 160 (1926); 159, 1 (1926).

Gärverlauf beobachtet. Ich möchte hier die entwickelte Kohlensäure als Maßstab für den enzymatischen Zuckerabbau gelten lassen. Während Glucose, wie zu erwarten war, in 3 bis 5 Tagen nach dem Impfen das Maximum der CO_2-Entwicklung zeigte (mit einer durchschnittlichen Tagesleistung von 70 bis 100 mg), wurde Maltose langsamer und unregelmäßig abgebaut.

Kurve 1.

Glucose- und Maltose-Reihe.



CO_2-Werte.

——— Glucose + P pH = 4,8 — — — Maltose + P pH = 4,8
—.—.— Glucose — P pH = 5,2 ..... Maltose — P pH = 5,2

Tabelle I.

Reihenversuch mit Glucose und Maltose in Anwesenheit und Abwesenheit anorganischen Phosphats.

Nährlösungen wurden am 27. 4. 1936 mit Leinsamenmycel geimpft.

Kolben I	Glucose + P*	Kolben IV	Maltose + P
Kolben II	Glucose + P	Kolben V	Glucose — P
Kolben III	Maltose + P	Kolben VI	Maltose — P

Datum	Kolben I		Kolben II		Kolben III		Kolben IV		Kolb. V	Kolb. VI
	CO_2 mg	P mg	CO_2 mg	P mg	CO_2 mg	P mg	CO_2 mg	P mg	CO_2 mg	CO_2 mg
28. 4.	8,8	175	8,8	175	4,4	175	6,6	175	6,6	4,4
29. 4.	22,0	175	26,4	175	8,8	175	17,6	175	16,5	11,0
30. 4.	50,6	175	68,2	175	13,2	175	22,0	175	37,4	17,6
1. 5.	66,0	175	82,0	160	19,8	175	26,4	175	44,0	22,0
2. 5.	72,6	160	68,2	165	24,2	175	30,8	175	48,4	26,4
3. 5.	70,4	175	74,8	175	39,6	170	41,8	175	46,2	35,2
4. 5.	48,4	175	55,0	175	33,0	175	39,6	167,5	45,4	33,0
5. 5.	41,8	175	37,4	175	59,4	170	55,0	170	44,0	26,4
6. 5.	46,2	175	28,6	175	55,0	170	48,4	167,5	41,8	27,4
7. 5.	26,4	175	26,4	175	50,6	175	41,8	175	22,0	28,6
8. 5.	19,8	175	22,0	175	41,8	175	35,2	175	13,2	28,6
9. 5.	13,2	175	17,6	175	44,0	170	48,4	175	17,6	19,8
10. 5.	8,8	175	17,6	175	14,2	175	19,8	175	15,4	22,0
11. 5.	11,0	175	19,8	175	15,6	175	22,0	175	13,2	19,8
13. 5.	16,2	175	17,6	175	13,2	175	11,0	175	13,2	26,4
19. 5.	74,8	175	79,2	175	66,0	175	70,4	175	84,0	61,6

Nach Abbrechen der Versuche: Kolben I, II und V keine Zuckerreaktion, Kolben III, IV, VI schwache Zuckerraktion.

PH-Werte während der Vergärung.

Kolben	I	II	III	IV	V	VI
Anfangsbest. am 28. 4.	4,7	4,7	4,7	4,8	5,3	5,2
5. 5.	4,0	4,0	4,4	4,4	5,0	4,9
11. 5.	4,0	4,0	4,3	4,4	4,8	4,9
19. 5.	4,0	4,0	4,3	4,4	4,8	4,9

* Unter Glucose + P und Glucose — P (Maltose) sind die im Methodenteil erwähnten Nährlösungen mit und ohne anorganischem Phosphat gemeint.

Tabelle II.

Reihenversuch mit Glucose und Maltose.
Alkoholwerte.

Die mitgeteilte Versuchsreihe wurde wie in Tabelle I angegeben mit dem Unterschied, daß die Versuchskolben bei verschwindender Zuckerreaktion abgebrochen wurden und der Alkohol bestimmt wurde.

Kolben I Glucose + P	Kolben IV Maltose + P
Kolben II Glucose + P	Kolben V Glucose — P
Kolben III Maltose + P	Kolben VI Maltose — P

Es wurden abgebrochen:

Kolben	nach Tagen	entwick. CO_2-Menge	gefund. Alkoholmenge
I	20	504,0 mg	371,4 mg
II	20	497,8 mg	385,2 mg
III	36	521,7 mg	237,16 mg
IV	36	516,2 mg	258,28 mg
V	28	505,5 mg	312,52 mg
VI	36	409,0 mg	214,76 mg

Erst 2 bis 3 Tage nach dem Impfvorgang zeigte sich eine deutliche Mycelbildung und nach 7 bis 12 Tagen die höchste CO_2-Entwicklung mit einer durchschnittlichen Tagesleistung von 50 bis 60 mg. Während nach diesem Maximum der Abbau der Glucose nun schnell in ein Stadium langsamer Vergärung von 15 bis 20 mg pro Tag übergeht, fällt die CO_2-Kurve der Maltose langsamer und unregelmäßiger zu niederen Werten ab. Bei einigen hier nicht wiedergegebenen Versuchsreihen hörte das Wachstum sogar nach einigen Tagen starker Vergärung plötzlich fast auf, um dann wieder zu hohen Werten anzusteigen.

b) *Beobachtungen über die Phophorylierung der Maltose.*

Auch die Phosphorylierung, d. h. der vorübergehende Verbrauch zugesetzten, anorganischen Phosphats, der durch das Phosphatesesystem der Zelle vermittelt wird, zeigt hier ein anderes Bild. Während man bei der Glucose nach dem 4. bis 6. Tage im allgemeinen einen einmaligen Phosphorschwund von 10 bis 15 mg P beobachtet, ist der anorganische Phosphorspiegel in der Maltoselösung während der Hauptvergärungszeit vom 6. bis 12. Tage Schwankungen unterworfen (Tabelle I und II), die deutlich das Ab und Auf der Phosphorylierungen oder mit anderen Worten die wechselnde Menge des entstandenen und wieder abgebauten Kohlehydratesters erkennen

lassen. Nach diesem von Monosacchariden abweichenden Verhalten war es daher wissenwert, wie sich der Spiegel des anorganischen Phosphats in den einleitenden Stadien des Maltoseabbaus verhalten würde.

Maltosehaltige Nährlösungen von üblicher Zusammensetzung von pH = 4,8 mit 750 mg KH_2PO_4 wurden im 1. Versuch (siehe weiter unten) mit Leinsamenmycel geimpft und nach Beginn der Auskeimung der Sporen (nach mikroskopischer Untersuchung), die nach 6 Stunden begann, zweistündlich der Phosphorspiegel untersucht (Versuch I).

Tabelle III.

Beobachtungen über die Phosphorylierung während des Einsetzens der Gärung von Maltose.

Stunden	Versuch I*			Versuch II			Versuch III		
	Kolb. I mg P	Kolben II mg P	CO_2-Werte mg	Kolb. I mg P	Kolben II mg P	CO_2-Werte mg	Kolb. I mg P	Kolben II mg P	CO_2-Werte mg
0	175	175		172,5	172,5		175	175	
2	175	175		172,5	172,5		175	175	
4	175	175	—	172,5	172,5	4,4	175	175	2,2
6	175	175		172,5	172,5		175	175	
8	175	175		172,5	172,5		175	175	
10	175	175	6,6	172,5	172,5	13,2	175	175	8,8
13	175	175		172,5	172,5		175	175	
15	175	175		172,5	172,5		175	175	
18	175	175		172,5	172,5		175	175	
20	175	175	8,8	172,5	172,5	19,8	175	175	24,2
23	175	175		172,5	172,5		175	175	
26	175	175		172,5	172,5		175	175	
30	175	175	11,0	172,5	172,5	22,0	175	175	26,4
Nach 30 St. entw. CO_2 =			26,4			39,4			61,6

Die angegebene Kohlensäure ist ein Mittelwert der beiden Versuchskolben.

Wenn hier keine Phosphorylierung zu beobachten war, so bestand immer noch die Möglichkeit, daß die geringen Sporenmengen nicht in der Lage waren, einen erkennbaren Verbrauch von anorganischem Phosphor anzuzeigen. Es wurde daher derselbe Versuch mit einer ausgebildeten Myceldecke wiederholt (Versuch II). Diese

* Die angeführten Werte rechnen vom Beginn der Auskeimung der Sporen.

Decke war 6 Tage auf einer gleichen Maltosenährlösung gezüchtet worden, deren Enzymsystem nach meinen Feststellungen (Tabelle I) zu dieser Zeit sicher die Fähigkeit besaß, im geeigneten Medium zu phosphorylieren. Die Decke wurde in steriler Maltosenährlösung längere Zeit gespült, um etwaige letzte Reste nicht zelleigener Substanzen zu entfernen und zum Impfen verwandt. Aber auch dieser Versuch wie ein anderer mit dem Unterschied, daß die Myceldecke vor dem gründlichen Spülen 3 Tage in sterilem Aqua dest. gehungert hatte (Versuch III), zeigten kein anderes Bild. Die nach 30 Stunden entwickelten 26,4, 59,4 und 61,6 mg CO_2 zeigen, daß sich die Nährlösung nach dieser Zeit schon in lebhafter Gärung befand, während der Spiegel des anorganischen Phosphats beim Einsetzen der Gärung sich jedoch auch bei dauernder Kontrolle nicht veränderte. In phosphorfreiem Milieu ausgeführte Gärversuche mit Maltose zeigten erwartungsgemäß eine deutliche Herabsetzung der Geschwindigkeit der CO_2-Entbindung.

c) *Die Alkoholbildung bei der Vergärung von Maltose.*

Die gebildete Alkoholmenge entsprach den Erwartungen (Tabelle II). Nach der Gleichung $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O = 4\,C_2H_5OH + 4\,CO_2$ können theoretisch aus 1 g Maltose 488,9 mg CO_2 und 511,1 mg C_2H_5OH gebildet werden. Da flB. neben wirksamen Zymasen noch über ein kräftiges Dehydrasensystem verfügt, hängt die gefundene Alkoholmenge zum Teil von der Vergärungsgeschwindigkeit des verwandten Zuckers ab. Je schwerer nämlich eine Zuckerart vom Zymasesystem des Erregers angegriffen wird, umso mehr besteht die Möglichkeit, daß die Geschwindigkeit der Dehydrierung des Alkohols und die Geschwindigkeit des zymatischen Abbaus des Zuckers sich einander nähern. Es ist der theoretische Fall denkbar, daß es zu einer Alkoholansammlung nicht kommen kann, da die Dehydrierungsgeschwindigkeit mit der Geschwindigkeit der zymatischen Spaltung übereinstimmt. So zeigt sich bei der Verwendung von Glucose ungefähr 75%, bei Maltose 50 bis 60% und bei Lactose 1 bis 2% der theoretischen Alkoholmenge bei verschwundener Zuckerreaktion.

d) *pH-Veränderungen in gärender Maltosenährlösung.*

Die Wasserstoffionenkonzentration sank während des Abbaus der Maltose um geringe Werte von 4.8 auf 4,5 bis 4,4. Man muß

dabei aber berücksichtigen, daß 750 mg KH_2PO_4 schon eine geringe Pufferwirkung ausüben (Tabelle I).

e) *Vergärung der Maltose in verschiedenen pH-Bereichen.*

Der unregelmäßige Verlauf der CO_2-Kurve und die Schwankungen des Phosphorspiegels bei der Vergärung der Maltose ließen vermuten, daß weder Maltose noch ein einheitliches Hydrolysenprodukt (Glucose), sondern ein Substratgemisch der tatsächlichen Vergärung unterworfen war, dessen Zusammensetzung entsprechend des ungleichen Ablaufs der Kinetik der Hydrolyse bzw. der zymatischen Spaltung wechselte. Der Angriff am Maltosemolekül kann entweder direkt an der Aldehyd- oder einer der Hydroxylgruppen erfolgen (man spricht dann von einer direkten Vergärung), oder aber es tritt eine Sprengung der glucosidischen Bindung und Zerfall in 2 Glucosemoleküle durch eine Maltasewirkung ein (indirekte Vergärung). Vergleiche an den CO_2-Kurven der Glucose und Maltose lassen erkennen (Kurve I), daß eine direkte Maltosevergärung langsamer vor sich gehen muß als ein indirekter Abbau, bei der die gebildeten Glucosemoleküle sehr schnell weiter vergoren und dementsprechend die CO_2-Kurve zu hohen Werten ansteigen würde. Daher lag die Annahme, wie schon oben erwähnt, sehr nahe, daß bei einer vorliegenden, gemischten Gärung die einzelnen Gipfelpunkte der CO_2-Kurve, vielleicht auch die Phosphorylierung, durch intermediär gebildete Glucose verursacht wurden.

Eine Klärung dieser Frage konnte nur herbeigeführt werden, wenn durch pH-Aenderungen der Nährlösung die eine Vergärungsform stark zurückgedrängt oder ganz ausgeschaltet wurde. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß bei pH = 5,2 die besten Wachstumsbedingungen für flB. herrschten.

Tabelle IV.

Bestimmung der Mycelmenge auf Maltoselösung mit verschiedenem pH unter gleichen Bedingungen.

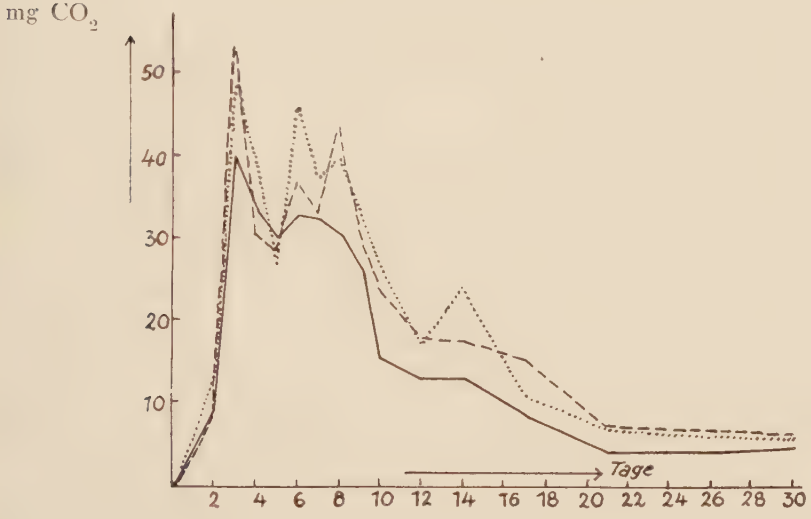
Datum	pH = 2,8	pH = 3,8	pH = 4,8	pH = 5,2	pH = 6,8
15. 5.	—	+	++	+++	+
17. 5.	—	++	+++	++++	+++
19. 5.	+	+++	+++++	++++++	++++
Mycel in mg	20,1	71,0	91,2	97,4	73,8

Die hierzu verwandten Pufferlösungen wurden aus Gemischen von H_3PO_4,KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 hergestellt.[31] Es waren aber alle Puffer so berechnet, daß in jeder Nährlösung nach der Pufferung 170,7 mg Phosphor enthalten waren.

Wurden aber CO_2-Kurven über den Gärverlauf der Maltoselösungen bei verschiedenem pH aufgestellt, so zeigte sich überraschend in saurem pH = 3,5 eine fast normale CO_2-Kurve.

Kurve 2.

Maltose-Serie bei verschiedenem pH.



—— Maltose pH = 3,5 — — — Maltose pH = 4,8 .... Maltose pH = 6,7

Geht man mit dem pH der Nährlösung noch mehr ins saure Gebiet, z. B. auf pH = 2,8, so lassen unter so ungünstigen Bedingungen Wachstumsschwierigkeiten wieder ein anormales Kurvenbild entstehen. Wie aber aus Tabelle IV S. 22 zu ersehen ist, kann man bei pH = 3,5 noch nicht von ausgesprochen ungünstigen Bedingungen sprechen. Nach diesen Vorversuchen war es meine Aufgabe, diejenige Wasserstoffionenkonzentration einer Nährlösung zu

31. Bio. Z. 153, 173 (1924).

finden, in der bei normalen Wachstumsbedingungen die Maltasewirkung bei flB. ausgeschaltet war.

f) *Die Suche nach Carbohydrasen im Enzymsystem v. flB.*

Bei der Bereitung von Enzymlösungen bediente ich mich der Erfahrungen, die man bei der Herstellung von Hefeextrakten gesammelt hatte.[32] Aber hier begegnete ich unerwarteten Schwierigkeiten. Die bei den Gärversuchen anfallenden Mycelmengen lohnten für eine Aufarbeitung nicht. Während die Hefe dem Forscher in beliebigen Mengen zur Verfügung steht, erreichten wir in Massenkulturen unter günstigen Bedingungen in 10 bis 15 ein Liter-Fernbachkolben nach 14 bis 17 Tagen 7 g Trockenmycelausbeute. Mit dieser geringen Ernte konnten einige Vorversuche ausgeführt werden. Zuerst einmal mußte geprüft werden, ob in dem vielseitigen Enzymsystem von flB. eine Maltase vertreten war.

5 g lufttrockenes Mycel von flB., das nicht länger als 4 Tage nach der Aufarbeitung gestanden haben durfte, wurden im sterilen Mörser 6 min. mit 2 ccm Essigester und Quarzsand (Merck) zu breiiger Masse verrieben, in 50 ccm Aqua. dest. aufgenommen und mit 1%igem NH_3 tropfenweise gegen Lackmus wiederholt auf den Neutralpunkt gebracht. Da Lackmus in dem pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 umschlägt und das Aktivitätsoptimum der Hefemaltase bei $\sim$ 6,8 liegt, begnügte ich mich hier mit 10 ccm m/15 Phosphatpuffer (auf pH = 6,8 eingestellt). Auffallend war der geringe Verbrauch von nur 0,5 ccm NH_3-Lösung zur Neutralisation, während bei vielen Hefearten unter gleichen Bedingungen bis 10 ccm angegeben werden. Es wird hier also beträchtlich weniger Essigester zur Zellverflüssigung verbraucht. Nach einem geringen Zusatz von Toluol, um die Gefahr einer Infektion zu vermeiden, blieb die Lösung 28 Stunden im Eisschrank bei $+4^\circ$ stehen und wurde dann zentrifugiert (30 min) und in 2 gleiche Flüssigkeitshälften geteilt. Eine Lösung wurde auf 100° (10 min) erhitzt und als Vergleichslösung benutzt. Ließ man jetzt Untersuchungs- wie Vergleichslösung im Thermostaten bei 28° auf 700 mg Maltose einwirken, nachdem beide Lösungen auf 100 ccm aufgefüllt waren, so mußte bei Anwesenheit von Maltase eine Hydrolyse zu beobachten sein.

32. R. Willstätter und W. Steibelt, Z. f. physiol. Chem. 111, 157 (1920) R. Willstätter und E. Bamann, Z. f. physiol. Chem. 151, 242 (1926); H. Sobotka und M. Holzman l. c. 17.

Tabelle V.

Versuch mit 12 Tage altem Mycel.

Einwirkungsdauer Stunden	Cu in mg	Spaltung in % auf Glucose berechn.	Vergleichslösung Cu in mg
0	73,3	—	73,3
22	84,6	17,7%	76,2
46	88,8	25,6%	76,4
66	90,3	28,8%	76,3

Versuch mit 3 Tage altem Mycel.

Einwirkungsdauer Stunden	Cu in mg	Spaltung in % auf Glucose berechn.	Vergleichslösung Cu in mg
0	73,7	—	73,3
22	100,2	47,3%	77,3
46	109,8	64,3%	76,4
66	113,1	70,4%	77,0

Aus den beiden hier angeführten Versuchen ist zu ersehen, daß im Enzymsystem von flB. eine α-Glucosidase vorhanden ist; die beiden Versuche zeigen aber auch deutlich, daß die Enzymwirkung in Uebereinstimmung mit dem Alter der Myceldecken rasch abnimmt, während ihre Gärfähigkeit über 18 Monate erhalten bleibt. Ein Monat alte Trockenpräparate zeigten keine Maltasewirkung mehr. Für umfangreiche Reihenversuche in verschiedenen pH-Bereichen mußten aus diesem Grunde große Mycelmengen zur gleichen Zeit zur Verfügung stehen, wenn man den Bereich der Wirksamkeit der Maltase durch Verhältniszahlen einzelner Versuche bestimmen wollte. Die hierzu nötigen Mengen von 40 bis 70 g Zellpräparat wurden schon nach 12tägiger Wachstumsperiode mit Hilfe des oben erwähnten Steril-Incubators gewonnen.

Je 6 g über Ton luftgetrocknetes Mycel wurde in der eben erwähnten Weise mit Essigester aufgeschlossen und dieser Enzymauszug mit einer maltosehaltigen m/10 Pufferlösung derart aufge-

füllt, daß der Endtiter einer 0,5%igen Maltoselösung entsprach. Die Zusammensetzung der Pufferlösungen entsprach den Angaben nach Sörensen.

Im
pH-Bereich von 3,3—5,5 aus sec. Na-citrat + HCl oder + NaOH (m/10)
pH-Bereich von 5,7—7,0 aus Na_2HPO_4 + K_2HPO_4 (m/3)
pH-Bereich von 7,8—8,8 aus Boratlösung + HCl (m/10)

Tabelle VI.

Bestimmung des Wirkungsbereichs und -optimums der Maltase.

Einwirkungsdauer in Stunden	pH = 3,3			pH = 4,0		
	Untersuchungslösung		Vergleichslösung	Untersuchungslösung		Vergleichslösung
	Cu mg	Spaltung %	mg	Cu mg	Spaltung %	mg
0	48,5	—	—	48,5	—	—
22	48,7	—	48,5	51,3	7,1	48,5
48	48,7	—	48,7	55,9	14,9	48,7
76	48,7	—	48,8	—	—	—
96	48,7	—	48,8	57,2	24,0	48,7
216	48,7	—	48,8	61,4	33,6	48,7
312	48,7	—	48,8	61,7	36,4	48,7
	Spaltung 0%			Spaltung 36,4%		

Einwirkungsdauer in Stunden	pH = 4,6			pH = 5,2		
	Untersuchungslösung		Vergleichslösung	Untersuchungslösung		Vergleichslösung
	Cu mg	Spaltung %	mg	Cu mg	Spaltung %	mg
0	49,0	—	49,0	49,8	—	49,8
22	55,9	19,3	49,3	71,2	38,5	50,0
48	60,4	31,9	49,5	82,1	88,2	50,0
76	64,6	43,7	49,3	85,3	96,9	50,0
96	67,7	52,3	49,3	86,5	100	50,0
216	70,0	58,8	49,3	86,5	100	50,0
312	70,6	60,5	49,3	—	—	—
	Spaltung 60,5%			Spaltung 100%		

Einwirkungsdauer in Stunden	pH = 5,3			pH = 5,4		
	Untersuchungslösung		Vergleichslösung	Untersuchungslösung		Vergleichslösung
	Cu mg	Spaltung %	mg	Cu mg	Spaltung %	mg
0	49,0	—	49,0	49,0	—	49,0
22	71,3	61,2	49,3	64,7	43,2	49,4
48	81,9	90,1	49,4	74,3	69,4	49,4
76	84,3	97,2	49,4	79,9	84,7	49,4
96	85,2	100	49,4	81,6	89,3	49,4
216	85,0	100	49,4	83,4	94,2	49,4
312	—	—	—	83,2	93,2	49,4
	Spaltung 100%			Spaltung 93,2%		

Einwirkungsdauer in Stunden	pH = 5,5			pH = 5,7		
	Untersuchungslösung		Vergleichslösung	Untersuchungslösung		Vergleichslösung
	Cu mg	Spaltung %	mg	Cu mg	Spaltung %	mg
0	49,0	—	49,0	48,5	—	48,5
22	56,9	21,8	49,3	54,0	15,2	48,9
48	65,4	44,9	49,5	61,0	34,5	49,0
76	72,8	65,2	49,4	68,1	54,1	48,7
96	75,6	73,0	49,4	72,3	65,5	48,8
216	79,1	82,6	49,4	75,4	74,3	48,8
312	79,8	84,5	49,4	75,8	75,4	48,8
	Spaltung 84,5%			Spaltung 75,4%		

Einwirkungsdauer in Stunden	pH = 7,8		
	Untersuchungslösung		Vergleichslösung
	Cu mg	Spaltung %	
0	51,3	—	51,3
22	—	—	—
48	60,5	23,7	51,6
76	65,6	36,9	51,6
96	68,0	43,1	51,6
216	74,7	60,4	51,6
312	75,9	63,5	51,5
	Spaltung 63,5%		

Das gefundene Wirkungsoptimum der Maltase von flB. von pH = 5,2 bis 5,3 stellt den Erreger nach diesem Gesichtspunkt zwischen Schimmelpilze und Schizosaccharomyceten mit einem Maltaseoptimum von 4,2 bis 4,5 bzw. 4,5 und untergärige Hefe mit einem Maltaseoptimum von 6,2 bis 6,8.[33] Erwartungsgemäß fällt das Wirkungsoptimum von flB. mit dem Wachstumsoptimum und den CO_2-Höchstwerten der Maltosegärung zusammen. Es scheint sich also die Vermutung zu bestätigen, daß die im Bereich des Wirkungsoptimum der Maltase entstehende Glucose an den sprunghaft hohen CO_2-Werten Anteil hat, wenn man auch nicht übersehen darf, daß die Höhe der zum Vergleich herangezogenen Vergärungskurve im pH-Bereich von 3,5 durch die ungünstigen Wachstumsbedingungen geringere CO_2-Werte zeigen muß.

g) *Die intermediär auftretende Glucose bei der Vergärung von Maltose.*

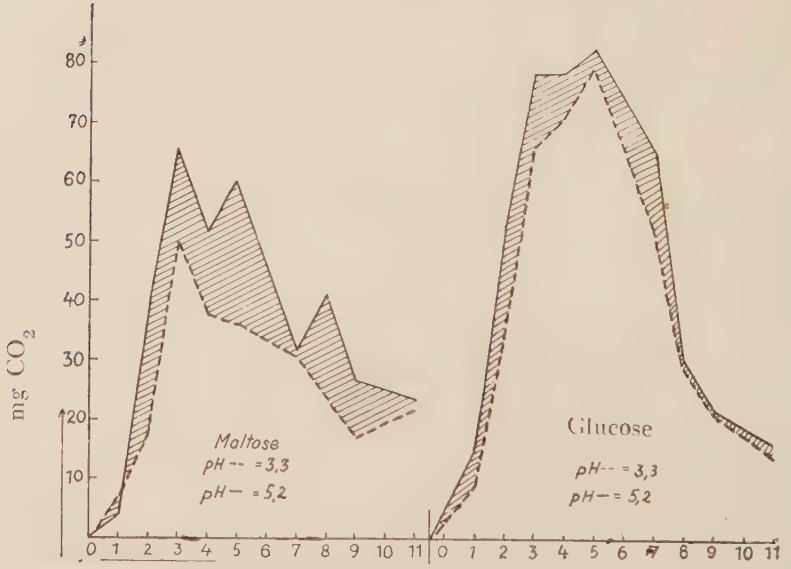
Vergleicht man nämlich die CO_2-Kurven vergärender Glucose- und Maltosenährlösungen bei pH = 5,2 wie bei pH = 3,3, (Kurve III),

Kurve 3.

Maltose und Glucose bei pH 3,3 und 5,2

Jede Kurve ist das Mittel aus 3 Versuchen.

Nährlösung siehe Methodenteil mit anorganischem Phosphat.



33. E. Hofmann, Bio. Z. 273, 320 (1933).

so erkennt man aus der verschiedenen Größe der beiden Flächen, die die beiden im pH von 3,3 und 5,2 entwickelten CO_2-Kurven begrenzen, deutlich den Unterschied, den ein pH-Wechsel aus einem pH, in der Maltose unwirksam ist, in ein pH mit optimaler Wirkung bei beiden Zuckern hervorruft. Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung, daß der Vergärung der Maltose, die im pH-Bereich des Wirkungsoptimums der Maltase verläuft, ein Substrat zu Grunde liegt, das ein fortgesetzt schwankendes Gemisch von Maltose und der jeweiligen H-Ionenkonzentration entsprechenden Menge von Glucose in statu nascendi darstellt.

h) *Gibt es einen Maltose-Phosphorsäureester?*

Weiter wurden Versuche unternommen, festzustellen, ob die Maltose bei direktem Abbau durch flB. in der Lage ist, wie z. B. Glucose zu phosphorylieren. Daß eine einleitende Phosphorylierung nicht möglich ist, wurde schon oben bewiesen. Bei den Untersuchungen über die Maltasewirksamkeit hatte ich gefunden, daß bei einem pH = 3,3 keine Spaltung der Maltose, d. h. keine Maltasewirkung mehr zu beobachten war. Bestand daher die Möglichkeit einer Bildung von Maltose-Phosphorsäureester durch flB., so mußten Wachstumversuche in diesem pH bei Anwesenheit anorganischen Phosphats eine Aenderung des Phosphorspiegels und somit eine Phosphorylierung zeigen. Auch bei vielen Wiederholungsversuchen konnte ich aber eine meßbare Phosphorylierung nie beobachten.

Tabelle VII.

Beobachtungen über die Phosphorylierung der Maltose.

Kolben I	Maltose + P	pH = 3.2
Kolben II	Maltose + P	pH = 3.2
Kolben III	Maltose + P	pH = 5,2
Kolben IV	Maltose + P	pH = 5.2

Die Pufferung der Lösungen wurde durch Phosphat verursacht.

pH = 3,3	75 mg H_3PO_4 (Sp. G. = 1,70) + 675 mg KH_2PO_4
pH = 5,2	720 mg KH_2PO_4 + 30 mg K_2HPO_4

Die Nährlösungen von gewöhnlicher Zusammensetzung wurden am 26. 4 mit 5 Tage altem Leinsamenmycel geimpft.

Datum	Kolben I		Kolben II		Kolben III		Kolben IV	
	P mg	pH-Werte	P mg	pH-Werte	P mg	pH-Werte	P mg	pH-Werte
26. 4.	175	3,3	175	3,3	170	5,3	170	5,3
27. 4.	180	3,3	175	3,3	170	5,3	170	5,3
28. 4.	175	3,3	175	3,3	170	5,2	170	5,2
29. 4.	175	3,3	175	3,3	170	5,1	170	5,2
30. 4.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	170	5,1
1. 5.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	162,5	5,1
2. 5.	175	3,3	175	3,3	165	5,0	165	5,1
3. 5.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	170	5,1
4. 5.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	165	5,1
5. 5.	175	3,3	175	3,3	162,5	5,0	165	5,1
6. 5.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	170	5,1
7. 5.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	170	5,1
8. 5.	175	3,3	175	3,3	170	5,0	170	5,1

Die Tabelle beweist in eindeutiger Weise, daß im pH-Bereich von 3,3, also unter völliger Ausschaltung der Maltase, in den hier mitgeteilten Zeitintervallen eine meßbare Phosphorylierung nicht zum Vorschein kommt. Wenn man sich noch daran erinnert, daß eine einleitende Phosphorylierung der Maltose bei pH = 4,8 auch in Zeitabständen von 2—3 Stunden nicht zu beobachten war, so muß hiermit noch einmal festgestellt werden, daß Maltose ohne meßbare Phosphorylierung von flB. vergoren wird.

Aus bereits früher erwähnten Versuchen geht hervor, daß im maltasewirksamen pH-Bereich um 5,2 6 bis 8 Tage nach dem Einsetzen der Gärung ein Schwund von anorganischem Phosphat zu beobachten war. Welcher Natur mochten diese Substrate der Phosphorylierung sein? Daß sich bei indirekter Vergärung von Maltose unter den Spaltprodukten Glucose befindet, wurde schon oben angenommen. Da jedoch die Gärgeschwindigkeit der Glucose die der Maltose bei weitem übertrifft, konnte man nie erwarten, daß sich größere oder wenigstens nachweisbare Mengen von Glucose in der Gärflüssigkeit anhäufen würden. Um diese Frage einer Klärung zuzuführen, wurden Vergärungen von Maltose im optimalen Wirkungsbereich der Maltase in Gegenwart anorg. P. derart durchgeführt, daß die Vergärungen jeweils am Höhepunkt des Phosphorschwundes unterbrochen wurden und danach das Gärgut einer weiteren Prüfung unterworfen wurde.

Zu diesem Zweck habe ich zunächst in Lösungsgemischen von Glucose und Maltose bekannter Zusammensetzung die Empfindlichkeitsgrenze der polarimetrischen und der Betrandschen Reduktionsmethode gegenüber Glucose bestimmt.

Die untersuchten Zuckergemische bestanden aus:

50 ccm Aqua dest.	0,04 g $MgSO_4$	entweder	1 g Glucose
0,01 g Asparagin	0,75 g KH_2PO_4	oder	1 g Maltose

Da der Bestimmungsfehler nicht 0,05 ccm $KMnO_4$-Lösung überschreitet, so mußte es möglich sein, neben 50 mg Maltose 0,45 mg oder 0,9% Glucose nachzuweisen. Es wurden daher in 3 verschiedenen Konzentrationen Bestimmungen ausgeführt:

Lösung I enthielt die angesetzte Mischung von Glucose und Maltose.

Lösung II, die dieselbe Zusammensetzung hatte, wurde erst 3 Stunden bei ca. 100° mit 2,5%iger Salzsäure hydrolysiert und dann wie Lösung I der Bertrandschen Zuckerbestimmung unterworfen.

Maltose : Glucose	Lösung I (n/10) $KMnO_4$-Lösung		Lösung II $KMnO_4$-Lösung		Lös. I Cu	Lös. II Cu	Unterschied
	ccm	ccm	ccm	ccm	mg	mg	
50 mg : 0 mg	8,65	8,65	14,90	14,85	55,0	94,9	39,1
45 mg : 5 mg	9,30	9,35	14,25	14,25	59,2	90,7	31,5
40 mg : 10 mg	9,90	9,85	13,60	13,50	63,0	86,6	23,6

In Parallelversuchen überschritt der Bestimmungsfehler nicht 0,1 ccm $KMnO_4$-Lösung.

Das bedeutet für Glucose einen Bestimmungsfehler von 20 mg.

Gleichzeitig und parallel laufend mit dem soeben beschriebenen Versuch wurden Beobachtungen mit dem Ziele angestellt, festzustellen, bei welcher niedrigsten Glucosekonzentration in Anwesenheit gleicher anorganischer Phosphatmengen eine Phosphorylierung noch nachgewiesen werden kann.

Tabelle VIII.

Beobachtung der Phosphorylierung bei verschiedener Glukosekonzentration.

Die in jedem Versuch angegebene Zuckermenge bezieht sich auf 50 ccm einer gewöhnlichen Nährlösung.

Datum	10 mg		20 mg		30 mg		40 mg		50 mg		100 mg		200 mg	
	P mg	Zucker reakt.	P mg	Zucker reakt.	P mg	Zucker reakt.	P mg	Zucker reakt.	P mg	Zucker reakt.	P mg	Zucker reakt.	P mg	Zucker reakt.
16. 4.	170	+	170	+	170	+	170	+	170	+	170	+	170	+
17. 4.	170	+	170	+	170	+	170	+	170	+	170	+	170	+
18. 4.	170	—	170	+	170	+	170	+	162,5	+	170	+	170	+
19. 4.	170	—	170	—	170	—	170	+	170	+	160	+	160	+
20. 4.	170	—	170	—	170	—	170	—	170	+	162,5	+	170	+
21. 4.	170	—	170	—	170	—	170	—	170	—	170	+	170	+
22. 4.	170	—	170	—	170	—	170	—	170	—	170	+	170	+
23. 4.	170	—	170	—	170	—	170	—	170	—	170	—	170	—

Die Zusammenstellung der Ergebnisse der Bestimmung zeigt, daß unabhängig von der Menge des anorganischen Phosphats eine Phosphorylierung nicht unter einer Glucosekonzentration von 0,01% (50 mg Glucose) zu messen war. Andererseits ergab sich bei diesen Versuchen die interessante Tatsache, daß bei einem Phosphorschwund von 7,5 mg anorganischen Phosphats in Gegenwart von 50 mg Glucose dieser Zucker bei Annahme eines Robisonesters $C_6H_{11}O_6 \cdot H_2PO_3$ fast völlig verestert sein mußte, was bei flB. sonst nie beobachtet wurde.

Unterbricht man die Gärung der Maltose in einem Augenblick, in dem von dem verfügbar gewesenen 750 mg anorganischen Phosphats 15 mg gebunden wurden, so findet man überraschender Weise nach Aufarbeitung der Restlösung keine Glucose (Bestimmungsgrenze 20 mg), obwohl auf Grund des Phosphorschwundes von 15 mg mindestens 86,7 mg bei Annahme eines Monoesters nachweisbar sein müßten. Berücksichtigt man diese Ueberlegung und ferner die Tatsache, daß Maltose selbst keiner Phophorylierung unterliegt, so ist die Annahme naheliegend, daß der Phosphor von einem resynthetisierten Kohlenhydrat[34] gebunden wurde. Diese Deutung ist um so wahrscheinlicher, als wie bereits einleitend ange-

34. l. c. 9.

deutet in der Phase der Alkoholdehydrierung Milchsäure nachgewiesen wurde und flB. atmosphärischen Sauerstoff verbrauchen kann.

Die Isolierung der Gluconsäure.

Bei Reihenversuchen in einem Nährmedium mit ungünstigem pH oder einem schwer vergärbaren Zucker (Lactose), veränderte sich das äußere und morphologische Bild des Erregers ganz auffallend. Es traten keine zusammenhängende Myceldecken mehr auf, sondern kleine Pilzfäden durchsetzten gleichmäßig die Nährlösung, und auf der Oberfläche bildete sich rasenartig an vielen Stellen ein weißes Luftmycel. Gleichzeitig war ein meßbarer Unterdruck in Versuchskolben zu beobachten, der darauf hinwies, daß flB. durch eine starke Atmung sich den ungünstigeren Verhältnissen anzupassen suchte. Diese Fähigkeit schloß die Möglichkeit in sich, daß flB. bei Gegenwart einer Glucoseoxydase[35] die vorhandene Glucose unter Mitwirkung des Luftsauerstoffs in die entsprechende Hexonsäure verwandeln konnte. Bei Essigbakterien, Aspergillus- und Penicillienarten war diese Fähigkeit zur Gluconsäurebildung (die freie Aldehydgruppe der Glucose wird in die Carboxylgruppe übergeführt) schon lange bekannt.

Nach Literaturangaben ist die Ausbeute der Gluconsäure stark von der Zusammensetzung der Nährlösung abhängig. Da die Angaben über den nötigen N-Gehalt der Nährlösung auseinandergehen,[36] stellte ich mir eine den Eigenschaften von flB. angepaßte Nährlösung zusammen:

auf 1000 ccm Aqua dest.
100 g Glucose (Maltose)
0,5 g Ammoniumsulfat
1 g KH_2PO_4
0,25 g $MgSO_4$ $7H_2O$.

Zur Ausführung der Versuche benutzte ich 1 Liter-Fernbachkolben, die mit 400 ccm Nährflüssigkeit unter sterilen Bedingungen beschickt wurden und achtete nach dem Impfen mit Leinsamen-

35. Müller, Ergebnisse der Enzymforschung V 259; Bernhauer, Die oxydativ. Gärungen 1923, Berlin; Birkinshaw, Biolog. Reviews 12, 366 (1937).

36. Bernhauer, l. c. 35; Birkinshaw, l. c. 35.

mveel darauf, daß die über der Flüssigkeit sich befindende Luft gleichfalls unter sterilen Bedingungen dauernd erneuert wurde. Nach einigen Tagen wurde durch tägliche Zuckerbestimmungen der Gärverlauf verfolgt und bei schwacher Zuckerreaktion der Versuch abgebrochen und zum Nachweis der Gluconsäure weiter verarbeitet. Das pH war von 4.7 auf 3.9 gesunken. Die Versuche verliefen aber negativ. Wie sich später herausstellte, war in dieser Versuchsanordnung die Belüftung nicht ausreichend. Es wurden daher zu den nachfolgenden Bestimmungen Durchlüftungskolben nach Kluyver benutzt, in denen während des ganzen Gärverlaufs Preßluft durch die Lösung perlte und in jeden Kolben von 1 Liter Fassungsvermögen 50 g $CaCO_3$ nachgegeben wurden. Alle Handhabungen wurden unter streng sterilen Bedingungen ausgeführt. Um die Gärdauer zu verkürzen, impfte ich mit kräftigen 6 Tage alten Decken. Von Wichtigkeit war das häufige Aufrühren des $CaCO_3$, um auch möglichst viel der organischen Säuren als Ca-Salze auszufällen und so der Einwirkung des Erregers zu entziehen. Nach 16tägiger Gärdauer war die Glucose fast umgesetzt und die in Lösung gegangenen Ca-Mengen auf ungefähr 14 g gestiegen.[37] Hier wurden die Versuche abgebrochen, je 1200 ccm der Maische von vorhandenem Zellmaterial und überschüssigem $CaCO_3$ durch ein Faltenfilter getrennt und im Vakuum bei 35—40° auf 20 bis 25 ccm eingeengt. Dabei fielen geringe Mengen anorganischer Ca-Salze (wahrscheinlich neben $Ca(HCO_3)_2$, $CaSO_4$ und $Ca_3(PO_4)_2$ aus Nährsalzen) aus der sirupartigen Flüssigkeit aus. Nach nochmaligem Filtrieren wurde die Lösung mit 200 ccm 96%igem Alkohol versetzt, wobei ein weißer Niederschlag die Anwesenheit organischer Ca-Salze anzeigte. Ein weiteres Zugeben von Alkohol ergab keinen weiteren Niederschlag. Durch dieses Vorgehen ließen sich Reste von Glucose größtenteils entfernen, die den Nachweis der Gluconsäure durch das Ausfallen von Osazon neben Gluconsäure-Phenylhydrazid unangenehm stören können. Ca-Gluconat ist in kaltem Alkohol fast unlöslich. Der Niederschlag der organischen Ca-Salze wurde in wenig Wasser gelöst und die organischen Säuren in einer Probe durch vorsichtiges Zugeben von verd. H_2SO_4 in Freiheit gesetzt. Nach dem positiven Ausfall der Reaktion von Berg[38] auf Gluconsäure, den auch andere

37. Bestimmung des Ca-Gehalts nach Bernhauer, Gärungschemisches Praktikum 1936, 128.

38. Bull. de l'assoc. de chimistes 11, 882, (1894).

Oxysäuren verursachen können, wurde die Gluconsäure als Phenylhydrazid nachgewiesen.[39]

Hierzu orientierte ich mich durch einige Blindbestimmungen über die Genauigkeit der Phenylhydrazinprobe. Da man annehmen konnte, daß der noch vorhandene Zucker infolge Osazonbildung den Nachweis der Gluconsäure als Phenylhydrazid stören würde, wurde versucht, in wechselnder Konzentration die Gluconsäure neben der Glucose nachzuweisen.

Tabelle IX.

Verhältnis von Gluconsäure : Glucose		durch Trennung von Glucosazon gefundenes Gluconsäurephenylhydrazid	Wiedergefundene Gluconsäuremenge	Schmelzpunkt Gluconsäurephenylhydrazid
Glsäure : Gl	in mg	in mg	in %	
10 : 10	250,2 : 264,6	197,9	54,2	194,5°
10 : 20	250,2 : 528,0	196,1	53,7	194,0°
3 : 10	74,2 : 250,0	70,7	65,3	196,5°
1 : 10	24,3 : 250,0	13,6	38,4	196,0°

Die Trennung des gebildeten Glucosazons und des Gluconsäurephenylhydrazids ist durch die verschiedene Löslichkeit der Salze in heißem Wasser möglich.[40] Zu den Blindbestimmungen wurden die gemischten Substanzen in 20 ccm Wasser gelöst und mit 5 ccm Eisessig und 5 g Phenylhydrazin nach der von W. Diemair, B. Bleyer und L. Schneider[40] angegebenen Methode weiter verarbeitet. Nach mehrmaligem Umkristallisieren fielen schöne, hellgelbe Kristalle an, die nach Reinigung mit Tierkohle farblos wurden und einen Schmelzpunkt von 194—196° zeigten.

In der durch flB. vergorenen Glucoselösung konnte auf diese Weise die Gluconsäure nachgewiesen werden.

Versuch 1:

Aus 120 g Glucose entstanden
4,281 g Gluconsäurephenylhydrazid
oder 2,932 g Gluconsäure — Schmelzpunkt 195°
Ausbeute betrug 2,44%.

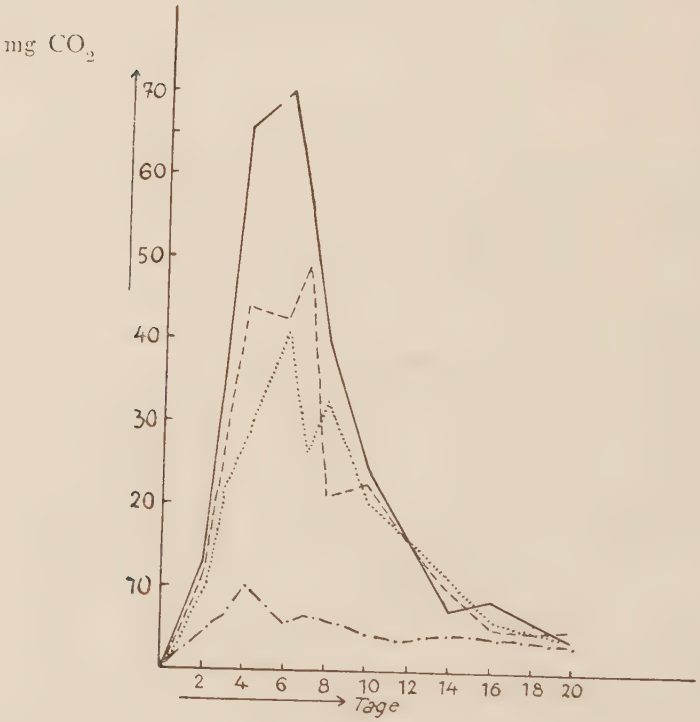
39. F. Fischer und F. Passmore B. 22, 2730 (1889); Bio. Z. 199, 162.
40. W. Diemair, B. Bleyer und L. Schneider, Z. Unters. Lebensmittel 69, 217 (1935).

Versuch II:

4,960 g Gluconsäurephenylhydrazid
oder 3,3972 g Gluconsäure — Schmelzpunkt 196,5°
Ausbeute betrug 2,83%.

Der Nachweis der Gluconsäure bestätigt die Annahme, daß der Erreger flB. eine Glucoseoxydase besitzt, die aber nach den Ergebnissen der Ausbeute nur schwach in Erscheinung tritt.

Kurve 4.
Glucose- und Gluconsäurevergärung.



——— Glucose + P pH = 4,8
– – – Glucose + P pH = 2,9
—:—:— Gluconsäure + P pH = 3,0
..... Gluconsäure + Glucose + P pH = 3,2

Diese Eigenschaft des Erregers machte es mir auch möglich, die sich intermediär bei der indirekten Vergärung der Maltose bildende Glucose als Gluconsäure nachzuweisen, wenn man wegen

der sehr geringen Ausbeute von 27,4 mg eine andere Möglichkeit der Bildung über Maltosecarbonsäure außer Acht läßt (Siehe Zusammenfassung). Vermutlich werden sich bei der indirekten Vergärung der Maltose wegen der größeren Abbaugeschwindigkeit nur äußerst geringe Mengen von Glucose bilden, die überhaupt nur zu fassen sind, weil das Oxydationsprodukt sehr viel langsamer vergoren wird, wie Kurve IV erkennen läßt, und es als Ca-Gluconat der weiteren Vergärung entzogen ist. Nicht unerwähnt an dieser Stelle soll bleiben, daß das dem flB. sehr nahe stehende Fusarium oxysporum dagegen nicht in der Lage war, auch nur Spuren von Gluconsäure zu bilden, auch dann nicht, wenn die Glucosenährlösung als P-Donator Muskeladenylsäure enthielt.

Die vergorene Maltoselösung wurde in gleicher Weise wie bei Glucose auf Gluconsäure aufgearbeitet. Das neben dem Gluconsäure-Phenylhydrazid ausfallende Maltosazon wurde auch durch Auslaugen mit heißem Wasser von dem ersten getrennt; doch war hier die Trennung schwieriger und gelang erst nach mehrmaligem Umkristallisieren, wodurch die Ausbeute sehr gering wurde. Aus 100 g Maltose wurden gefunden:

32,7 mg Gluconsäurephenylhydrazid $F° = 196{,}0°$
oder 22,4 mg Gluconsäure.

Die Ausbeute beträgt also 0,02%.

Es wurde als Blindbestimmung ausgeführt:

Maltosazon $F° = 204{,}0°$ in der Literatur $F° = 205°$ (208°) [41]
Gluconsäureph.hydr. $F° = 194\text{-}196°$ in der Literatur $F° = 195{,}5°$ [42]

Rohausbeute an Gluconsäurephenylhydrazid aus Untersuchungslösung:

	78,9 mg	$F° = 198{,}5°$
nach 2maligem Umkristallisieren		$F° = 196{,}5°$
nach 3maligem Umkristallisieren	32,7 mg	$F° = 196{,}0°$

Elementaranalyse:

Substanz:		4,987 mg
CO_2	:	9,199 mg
H_2O	:	2,666 mg

41. E. Fischer, B. 41, 76 (1908), auch Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden II 115, 151, 168.
42. l. c. 40.

Danach ergibt sich:

Berechnet aus $C_{12}H_{18}O_6NO_2$	gefunden
C = 50,52	C = 49,87
H = 6,34	H = 5,94
N = 9,78	N = 9,54 (nach Dumas)

Die Isolierung der Milchsäure.

Bei der Aufarbeitung auf Gluconsäure waren neben Essigsäure und Weinsäure auch größere Mengen von Milchsäure mit dem Hopkins'schen Reagenz[43] in der Vorprobe nachzuweisen. Obwohl die Anwesenheit der Milchsäure bei der Alkoholdehydrierung durch filB. schon nachgewiesen wurde,[44] war es erst an dieser Stelle möglich, sie in größeren Mengen zu fassen und sie als Zn-Lactat zu identifizieren.[45]

Der aus 1200 ccm unter den oben erwähnten Bedingungen für Gluconsäurebildung aus vergorener Glucoselösung gewonnene Niederschlag von organischen Ca-Salzen wurde nach der Methode von F. Schenk[46] von Eiweißresten gereinigt, mit verd. H_2SO_4 angesäuert und aus der sirupartigen Lösung die flüchtigen Säuren mit Wasserdampf abgetrieben. Dabei wurden nicht mehr als 300 ccm Wasser überdestilliert, da die Milchsäure mit Wasserdämpfen auch etwas flüchtig ist.[47] Nach darauffolgender Sättigung mit Na_2SO_4 wurde die Flüssigkeit 24 Stunden im Soxleth mit Aether extrahiert. Der von Aether befreite Aetherextrakt zeigte mit Hopkins Reagenz eine starke Milchsäurereaktion. Er wurde daher in 200 ccm Wasser aufgenommen und mit einem Ueberschuß von $PbCO_3$ 1 Stunde auf siedendem Wasserbad erhitzt, um Oxysäuren und Phosphorsäure zu entfernen, nach 12stündlichem Stehen im Eisschrank vom Bleiniederschlag abfiltriert, durch H_2S entbleit und entlüftet und durch einstündiges Erwärmen mit überschüssigem, geschlemmten $ZnCO_3$ auf dem Wasserbad in das Zn-Salz übergeführt. Das Zn-Salz wurde einmal umkristallisiert und im Brutschrank getrocknet.

Ausbeute: 141,7 mg Zn-Lactat aus 120 g Glucose.

43. Fletcher und Hopkins, Jl. of Phys. 35, 247 (1906/07).
44. l. c. 9.
45. Bio. Z. 38, 59; 45, 32 (1912).
46. F. Schenk, Arch. ges. Phys. 55, 203.
47. Beilstein, Handb. d. organ. Chem. 3, 261 (1921).

Bestimmung des Kristallwassers:

Porzellantiegel ohne Substanz	13,8862 g
Porzellantiegel mit Zn-salz	13,9984 g
nach Trocknen 2 Std. im Trockenschrank bei ~ 110° mit Zn-salz	13,9835 g
Verlust	0,0149 g

Das Zn-Lactat hat also von 112,2 mg 14,9 mg als Kristallwasser verloren oder 13,28%.

optisch aktives Zn $(C_3H_5O_3)_2$ 2 H_2O = 12,88% Kristallwasser,
racemisches Zn $(C_3H_5O_3)_2$ 3 H_2O = 18,18% Kristallwasser.

Nach dieser Bestimmung müßte daher die Milchsäure in optisch aktiver Form vorgelegen haben.

Bestimmung des ZnO-Gehalts:

Porzellantiegel mit getrocknetem Zn-salz	13,9836 g
Porzellantiegel nach Veraschung	13,9187 g
Porzellantiegel allein	13,8862 g
Geglühtes Znoxyd	0,0325 g

Die Bestimmungen haben also Folgendes ergeben:

	gefunden	theoretisch
Zn $(C_3H_5O_3)_2$ ohne Kristallwasser	33,36%	33,44%
Zn $(C_3H_5O_3)_2$ 2 H_2O	28,96%	29,04%

Im Polarisationsrohr zeigte das gereinigte, gefundene Zn-Lactat eine deutliche Rechtsdrehung. Danach muß die durch flB. gebildete Milchsäure optisch aktiv und linksdrehend sein.

Die Vergärung der Lactose.

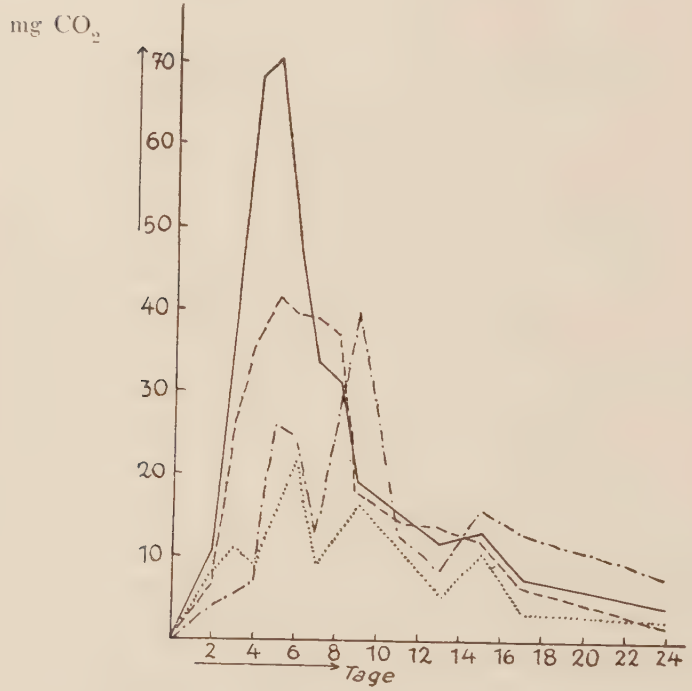
a) *Allgemeines Bild der Vergärung an Hand der CO_2-Kurve.*

Zur weiteren Klärung des Disaccharid-Abbaus durch flB. wurde ein anderer Zucker des Gentiobiosetyps, die Lactose, zur Untersuchung herangezogen. Da dieser Zucker von einer großen Anzahl von Erregern langsamer als Maltose und Saccharose vergoren wird (eine Ausnahme bildet z. B. Bakterium acet. lact.), war es nicht verwunderlich, daß auch unser Erreger die Lactose nur sehr langsam abbaute. Es bildete sich schon nach wenigen Tagen auf den Lactosennährlösungen ein deutliches Luftmycel aus, und ein starker Unterdruck im Versuchskolben deutete auf eine starke Atmung des Erregers hin. Die CO_2-Kurve zeigte dementsprechend niedrige Werte, die nach 6 bis 10 Tagen zu Höchstwerten von 25 bis 30 mg

CO_2 anstiegen. Auffallend ist der sehr unregelmäßige Kurvenverlauf, der im Verhältnis zur Glucosevergärung besonders stark ins Auge fällt.

Kurve 5.

Glucose- und Lactosevergärung.



——— Glucose + P pH = 4,8 ..... Lactose + P pH = 4,8
— — — Glucose — P pH = 4,8 —:—:— Lactose — P pH = 4,8

Das Luftmycel war immer dann besonders stark entwickelt, wenn sich die Kohlensäurewerte um Gipfelpunkte der Kurve bewegten.

b) *Einfluß des anorganischen Phosphats auf den Gärverlauf der Lactose.*

Auffallenderweise zeigten P-freie Nährlösungen kein vermindertes Wachstum wie bei Glucose und Maltose, sondern sie wurden schneller als Nährlösungen mit anorganischem Phophat vergoren. Viele Versuchsreihen zeigten immer wieder das gleiche Bild. Wenn

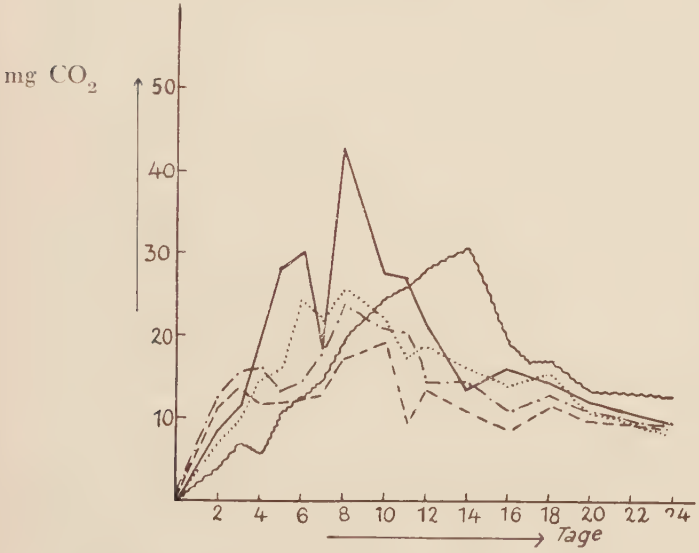
man von der Voraussetzung ausgegangen wäre, daß die Anwesenheit von Phosphor für den enzymatischen Kohlenhydratabbau unerläßlich ist, so mußte hier ein Versuchsfehler vorliegen. Zuerst wurde die Lactose auf Verunreinigungen von Phosphor untersucht. 500 mg Lactose wurden mit HNO_3 im Porzellantiegel verascht und mit dem Rückstand die Briggsche P-Bestimmung ausgeführt (Fehlergrenze $\pm$ 0,0005 mg).

Tiegel ohne Substanz	14,5532 g
Tiegel mit Substanz	15,0550 g
Tiegel mit Ascheresten	14,5536 g

Der Nachweis auf Phosphor verlief negativ. Weiterhin bestand die Möglichkeit, daß die auf Monoester berechneten hohen Phosphatmengen der Nährlösung (750 mg auf 2 g Lactose in 50 ccm Lösung) das Wachstum ungünstig beeinflußten. Es wurden daher Lactoselösungen mit verschiedenem Phosphatgehalt vergoren, und

Kurve 6.

Lactosevergärung mit verschiedener P-Menge.



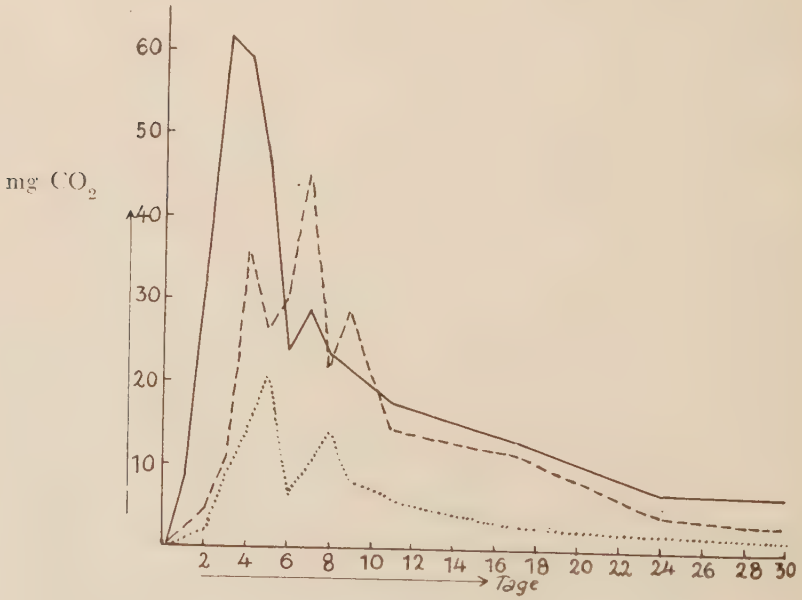
— — — Lactose + 750 mg KH_2PO_4
—:—:— Lactose + 300 mg KH_2PO_4
..... Lactose + 120 mg KH_2PO_4
Lactose + 120 mg Muskeladenylsäure
——— Lactose — P

berechnet auf 50 ccm H_2O.

zwar ging ich bis zu einer unteren Grenze von 120 mg Phosphat, die in Glucose- und Maltosenährlösungen gerade noch ausreicht, um eine bei diesen Zuckern bei Phosphatmangel auftretende Verringerung der Gärgeschwindigkeit noch nicht in Erscheinung treten zu lassen. Auch die Zugabe des organischen P-Donators Muskeladenylsäure, der sonst starke, wachstumbeschleunigende Eigenschaften besitzt, konnte erst in der letzten Hälfte der Lactosegärung höhere CO_2-Werte als P-freie Lactosenährlösungen verursachen. Wir haben hier also den bemerkenswerten Fall, daß die Gegenwart von Phosphat, deren Ausmaß weit unter der für eine Esterbildung stöchiometrisch berechneten Menge liegt, nicht das Wachstum anregt, sondern sogar hemmend wirkt. Der Verlauf der Phosphorylierung ist der der Maltose ähnlich mit dem Unterschied, daß hier nur ein einmaliger P-Schwund zu beobachten ist. Der gebildete Alkohol wird durch die hier verhältnismäßig kräftiger in Erscheinung tretende Dehydrasentätigkeit umgesetzt; denn auch während der Hauptvergärung abgebrochene Versuche ergaben nur 10 bis 20 mg C_2H_5OH statt der theoretischen Menge von 511,1 mg (Tabelle XI).

Kurve 7.

Vergärung von Glucose, Lactose und Galaktose.



——— Glucose + Galaktose + P pH = 4,9
— — — Galaktose + P pH = 4,9 ..... Lactose + P pH = 4,9

c) *Die Suche nach der Lactase.*

Wenn man bedenkt, daß das Lactosemolekül bei der Hydrolyse 1 Mol Glucose + 1 Mol Galaktose ergibt, so läßt die langsame Vergärung der Lactose vermuten, daß flB. über Lactase nicht verfügen kann und eine direkte Vergärung der Lactose langsam verläuft. Eine Versuchsreihe zum Vergleich der Gärgeschwindigkeiten von Galaktose, Glucose + Galaktose und Lactose zeigt deutlich, daß die einzelnen Spaltprodukte Glucose und Galaktose wie auch ihr Gemisch durch flB. viel schneller vergoren werden, als die Lactose. Es war daher dem ganzen Vergärungsbild entsprechend nicht verwunderlich, daß ich in den in gleicher Weise wie für die Bestimmung der Maltase aufgearbeiteten Mycelmengen keine Lactase fand.

Tabelle X.

Bestimmung der Lactasewirksamkeit.

Einwirkungszeit in Stunden	pH = 4,0 in Spaltung mg Cu		pH = 5,0 in Spaltung mg Cu		pH = 5,5 in Spaltung mg Cu	
	Unters.	Vergl.	Unters.	Vergl.	Unters.	Vergl.
0	51,2	51,5	49,9	51,2	51,2	51,2
22	51,6	51,8	50,2	51,6	51,6	51,7
48	51,7	52,1	50,4	51,6	51,8	51,7
76	51,4	51,9	50,4	51,6	51,5	51,7
96	51,4	51,6	50,2	51,5	51,4	—
312	51,4	51,6	50,0	51,5	51,4	51,7

Einwirkungszeit in Stunden	pH = 6,0 in Spaltung mg Cu		pH = 6,8 in Spaltung mg Cu	
	Untersuchung	Vergleich	Untersuchung	Vergleich
0	51,5	51,2	50,7	51,2
22	51,9	51,4	50,9	51,6
48	51,9	51,6	50,0	51,8
76	51,9	51,7	50,0	51,6
79	51,9	51,7	50,0	51,6
312	51,9	51,7	50,0	51,6

Tabelle XI.

Reihenversuch mit Glucose und Lactose.

Alkoholwerte u. Beobachtung der Phosphorylierung

Kolben I	Glucose + P	Kolben IV	Lactose + P
Kolben II	Glucose + P	Kolben V	Glucose — P
Kolben III	Lactose + P	Kolben VI	Lactose — P

Bei verschwindender Zuckerreaktion wurde abgebrochen:

Kolben	nach Tagen	entwickelte CO_2-Menge	gefundene Alkoholmenge
I	21	512,3 mg	334,2 mg
II	21	523,2 mg	316,7 mg
III	68	497,9 mg	10,12 mg
IV	68	487,3 mg	11,72 mg
V	28	513,8 mg	319,62 mg
VI	53	495,0 mg	21,63 mg

Bei der Phosphorylierung der beiden Zucker ergab sich folgendes Bild:

Datum	Kolben I	II	III	IV
26. 11.	175	175	27,4	27,4
27. 11.	175	175	27,4	27,4
28. 11.	175	175	27,4	27,4
29. 11.	175	160	27,4	27,4
30. 11.	170	175	27,4	27,4
1. 12.	175	175	26,5	27,4
2. 12.	175	175	26,8	26,7
3. 12.	175	175	27,4	27,4
4. 12.	175	175	27,4	27,4
5. 12.	175	175	27,4	27,4
7. 12.	175	175	27,4	27,4
8. 12.	175	175	27,4	27,4

Es zeigt sich also bei der Lactose die bemerkenswerte Tatsache, daß der Zucker direkt vergoren wird und dabei im Gegensatz zum Verhalten der Maltose doch eine klare Phosphorylierung zeigt. Die Feststellung, daß einerseits alle anorganischen Phosphatmengen auf die Lactosevergärung einen hemmenden Einfluß ausüben, andererseits aber ein Lactose-Phosphorsäureester gebildet werden kann, lassen deutlich erkennen, daß die Phosphorylierung bei einem Gärvorgang nicht nur eine ganz untergeordnete Bedeutung zu spielen braucht, sondern daß der betreffende Zucker ohne Phosphorylierung in P-freier Nährlösung mit Hilfe von flB. viel schneller vergoren werden kann.

Die Vergärung der Saccharose durch flB.

Um den Einblick über den enzymatischen Abbau der Disaccharide zu vervollständigen, wurde auch Saccharose durch unseren Erreger vergoren. Leider zeigte sich aber diese Zuckerart für eine Vergärung in verschiedenen pH-Bereichen als ungeeignet, da sich während der 14tägigen Gärdauer im Gegensatz zu der wesentlich rascher ablaufenden Hefegärung besonders in saurem pH von 3,0 bis 4,0 eine deutliche Hydrolyse bemerkbar machte. Es konnten daher Versuche einer direkten Vergärung des Zuckers nicht ausgeführt werden. Bei pH = 4,9 durchgeführte Reihenversuche ergaben neben einer deutlichen Phosphorylierung nach 5 bis 6 Tagen, daß Saccharose langsamer als Glucose durch flB. vergoren wird.

Hydrolyse der Saccharose bei verschiedenem pH.

Zeit in Tagen	Kolben I	Kolben II	Kolben III	Kolben IV
	pH = 5,7	pH = 5,7	pH = 3,2	pH = 3,1
0	3° 26′	3° 26′	3° 26′	3° 26′
2	3° 27′	3° 27′	3° 15′	3° 10′
4	3° 26′	3° 26′	2° 48′	2° 37′

Für diese Versuche wurden sterile Saccharosenährlösungen im Brutschrank bei 28° aufbewahrt und Proben in angegebener Zeit in 2 dcm-Röhren auf ihren optischen Drehwert untersucht.

Vorliegende Arbeit wurde im Hygienischen Institut der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin in der Zeit von Ostern 1936 bis Oktober 1937 auf Anregung von Herrn F. F. Nord ausgeführt. Ich benütze die Gelegenheit, um mich bei ihm auch an dieser Stelle für Unterstützung und Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte, zu bedanken. Ebenso sage ich Herrn Prof. K. Noack für sein Interesse sowie allen Professoren und Dozenten, bei denen ich Vorlesungen hörte, aufrichtigen Dank.

Lebenslauf.

Ich, Werner Wilhelm Hermann Engel, wurde am 28. August 1909 als Sohn des Lehrers Arthur Engel in Boxhagen-Rummelsburg (Berlin) geboren. Nach dreijähriger Volksschulbildung bestand ich Ostern 1920 die Aufnahmeprüfung an der Kantschule in Karlshorst und legte dort Ostern 1930 die Reifeprüfung ab. Darauf studierte ich an den Universitäten Berlin und Königsberg (Königsberg Sommersemester 1932) die Fächer Chemie, Biologie, Physik und Mathmatik u. a. bei den Professoren Schlenk, Tiede, Baumgarten, Noack, Zimmer, Hesse, Johnson, Westphal, Nernst, E. Schmidt, Bieberbach, Szeggö und Rothe. Während des mineralogischen Praktikums war ich Famulus bei Prof. Johnson. Im Sommersemester 1935 hielt ich mich bei Herrn Professor Drost an der Vogelwarte in Helgoland auf. Auf Anregung von Herrn Dr. F. F. Nord begann ich dann im April 1936 meine vorliegende Arbeit, die ich im Oktober 1937 beendigen konnte.